



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0084497
(43) 공개일자 2023년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2827 (2013.01)
A61K 47/6803 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2023-7011802
(22) 출원일자(국제) 2021년09월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년04월06일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/075005
(87) 국제공개번호 WO 2022/053650
국제공개일자 2022년03월17일
(30) 우선권주장
63/077,207 2020년09월11일 미국(US)

(71) 출원인
메디문 리미티드
영국 씨비2 0에이에이 케임브리지 케임브리지 바
이오메디컬 캠퍼스 프랜시스 크릭 애비뉴 1
(72) 발명자
키니어, 크리스타, 린
미국 20878 메릴랜드 게이더스버그 원 메디문 웨
이 메디문 엘엘씨
데이비스, 가레스, 찰스
영국 씨비21 6지에이치 케임브리지셔 케임브리지
그랜타 파크 밀스타인 빌딩 메디문 리미티드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장덕순, 류현경

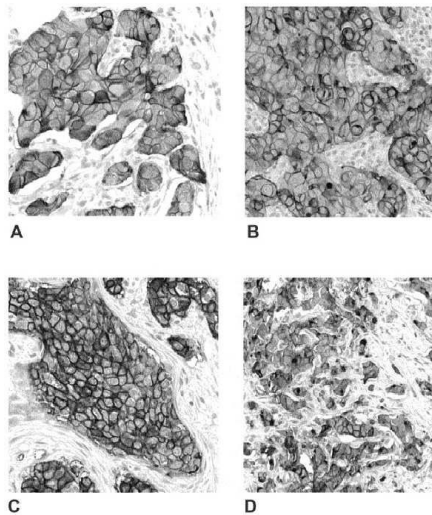
전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 발명의 명칭 치료용 B7-H4 결합 분자

(57) 요약

본 발명은 암 치료를 위한 결합 분자(예를 들어, 항체) 및 관련 항체-약물 접합체에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/6849 (2017.08)

A61K 47/6855 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/3015 (2013.01)

G01N 33/57492 (2013.01)

C07K 2317/21 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

C07K 2317/90 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

리즈, 데이빗, 가레스

영국 씨비21 6지에이치 케임브리지셔 케임브리지
그랜타 파크 밀스타인 빌딩 메디문 리미티드

퍼시벌-엘윈, 제니퍼, 루이스

영국 씨비21 6지에이치 케임브리지셔 케임브리지
그랜타 파크 밀스타인 빌딩 메디문 리미티드

앤드류스, 존, 에드워드

영국 씨비21 6지에이치 케임브리지셔 케임브리지
그랜타 파크 밀스타인 빌딩 메디문 리미티드

체즈브로, 존

미국 20878 메릴랜드 케이더스버그 원 메디문 웨이
메디문 엘엘씨

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 B7-H4에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- i. 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1(HCDR1), 중쇄 CDR2(HCDR2), 중쇄 CDR3(HCDR3), 경쇄 CDR1(LCDR1), 경쇄 CDR2(LCDR2) 및 경쇄 CDR3(LCDR3), 또는 이의 기능적 변이체;
- ii. 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- iii. 각각 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- iv. 각각 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체; 또는
- v. 각각 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서, 다음을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- i. 각각 서열번호 45 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL), 또는 이의 기능적 변이체;
- ii. 각각 서열번호 33 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL), 또는 이의 기능적 변이체;
- iii. 각각 서열번호 43 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL), 또는 이의 기능적 변이체;
- iv. 각각 서열번호 46 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL), 또는 이의 기능적 변이체;
- v. 각각 서열번호 47 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL), 또는 이의 기능적 변이체;
- vi. 각각 서열번호 31 및 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체;
- vii. 각각 서열번호 35 및 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체;
- viii. 각각 서열번호 37 및 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체; 또는
- ix. 각각 서열번호 39 및 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 다음을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- i. 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

i. 각각 서열번호 45 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, OVCAR4 세포주와 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 작용제에 접합되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 토포이소머라제 I 억제제, 튜블라이신 유도체, 피롤로벤조디아제핀, 항미생물제, 치료제, 전구약물, 펩티드, 단백질, 효소, 지질, 생물학적 반응 개질제, 약제, 림포카인, 이중 항체, 이중 항체의 단편, 검출 가능한 표지, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 방사성 동위원소 또는 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 이중 작용제에 접합되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 13

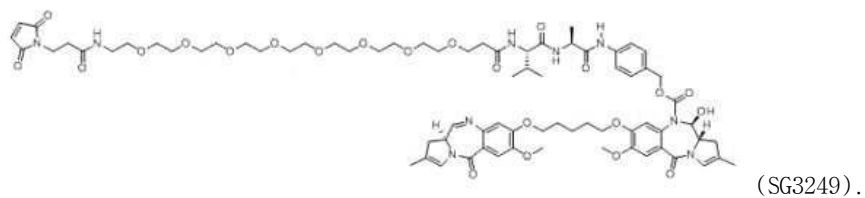
제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 토포이소머라제 I 억제제, 튜블라이신 유도체, 피롤로벤조디아제핀 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 이중 작용제에 접합되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 튜블라이신 AZ1508, 피롤로벤조디아제핀 SG3315, 피롤로벤조디아제핀 SG3249, 또는 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 이중 작용제에 접합되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

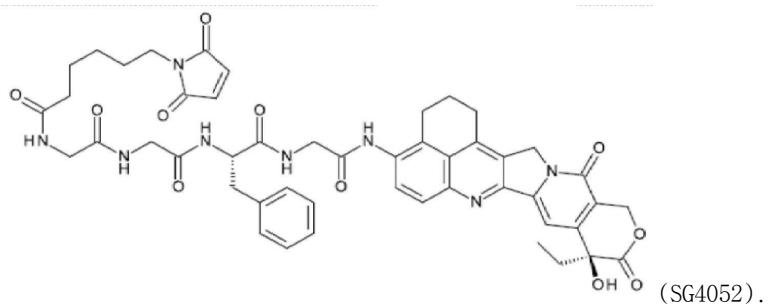
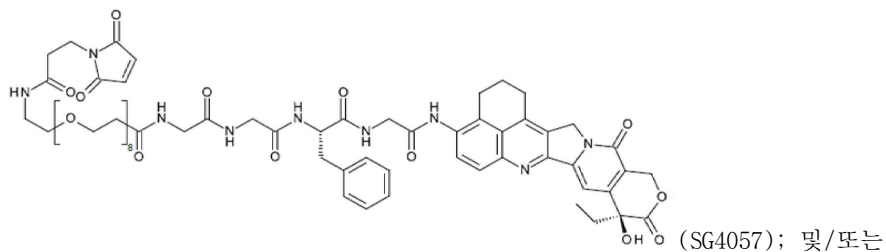
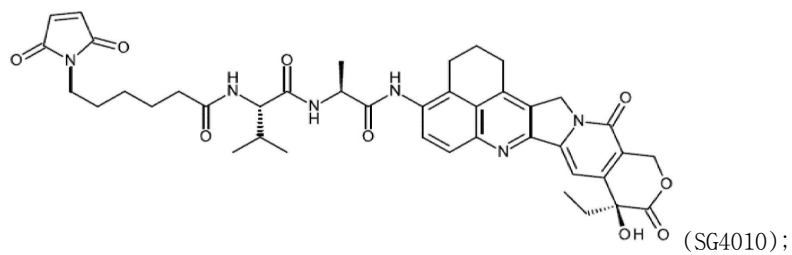
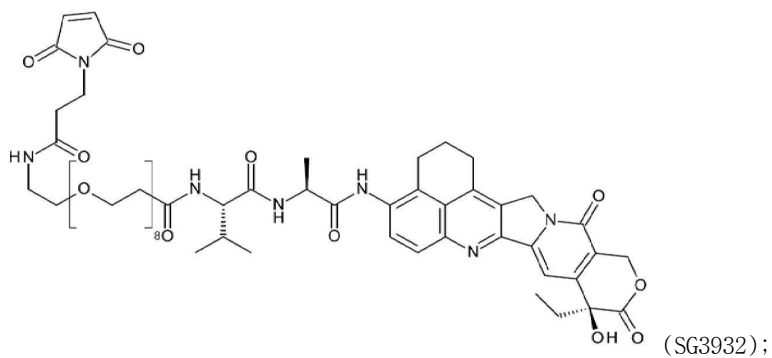
청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 다음의 피롤로벤조디아제핀 SG3249 세포독소에 접합되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:



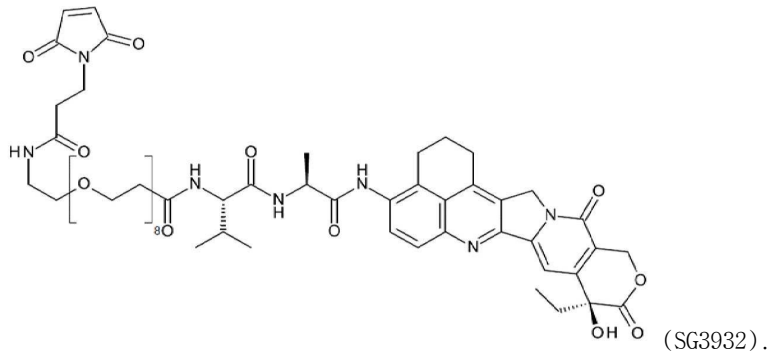
청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 다음에 접합되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:



청구항 17

제1항 내지 제14항 또는 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 다음에 접합되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:



청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 단클론 항체인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화 단클론 항체인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제약 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 22

제21항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포.

청구항 23

B7-H4에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법으로서, 숙주 세포에서 제22항에 따른 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 24

제23항의 방법에 의해 수득할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 25

B7-H4를 발현하는 암세포를 포함하는 암을 치료하는 방법으로서, 대상체에게 제1항 내지 제19항 또는 제24항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제20항의 제약 조성물, 또는 이들의 조합을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 26

암을 치료하는 데 사용하기 위한 제1항 내지 제19항 또는 제24항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제20항의 제약 조성물로서, 상기 암은 B7-H4를 발현하는 암세포를 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제약 조성물.

청구항 27

제25항에 따른 방법, 또는 제26항에 따라 사용하기 위한 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제약 조성물로서, 상기 암은 유방암, 난소암, 자궁내막암, 담관암종, NSCLC(편평 및/또는 선암종), 췌장암 및 위암으로부터 선택되는 것인, 방법 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제약 조성물.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른, 방법, 또는 사용하기 위한 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제

약 조성물로서, 상기 암은 유방암, 난소암, 자궁내막암 및 담관암종으로부터 선택되는 것인, 방법 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제약 조성물.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른, 방법, 또는 사용하기 위한 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제약 조성물로서, 상기 암은 호르몬 수용체-양성(HR+) 유방암, 인간 표피 성장 인자 수용체 2 양성(HER2+) 유방암 및 삼중 음성 유방암(TNBC)으로부터 선택되는 유방암인 것인, 방법 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제약 조성물.

청구항 30

샘플에서 B7-H4 폴리펩티드의 존재 또는 부재를 검출하는 방법으로서,

- i. 샘플을 제1항 내지 제19항 또는 제24항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제20항에 따른 제약 조성물을 접촉시켜 항체-항원 복합체를 제공하는 단계;
- ii. 상기 항체-항원 복합체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하고;
- iii. 여기서 항체-항원 복합체의 존재는 B7-H4 폴리펩티드의 존재를 확인시켜 주고;
- iv. 항체-항원 복합체의 부재는 B7-H4 폴리펩티드의 부재를 확인시켜 주는 것인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 항체-항원 복합체의 존재는 암 세포의 존재를 나타내고, 상기 항체-항원 복합체의 부재는 암 세포의 부재를 나타내는 것인 방법.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 샘플은 대상체로부터 획득할 수 있는 분리된 샘플인 것인 방법.

청구항 33

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, B7-H4 폴리펩티드는 암세포의 필수 구성요소인 것인 방법.

청구항 34

항체-약물 접합체(ADC)로서,

- (i) 다음을 포함하는 B7-H4 폴리펩티드에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편: 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1; 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3; 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1; 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2; 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3;
 - (ii) 절단 가능한 mp-PEG8-val-ala 링커; 및
 - (iii) 세포독성제를 포함하고, 여기서 세포독성제는 SG3932이고,
- ADC는 약 8의 약물 대 항체 비율(DAR)을 갖는 것인 항체-약물 접합체.

청구항 35

제34항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄(VH) 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄(VL)를 포함하는 것인 ADC.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(LC)를 포함하는 ADC.

청구항 37

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항의 ADC를 포함하는 제약 조성물.

청구항 38

B7-H4를 발현하는 암세포를 포함하는 암을 치료하는 방법으로서, 대상체에게 제34항 내지 제37항 중 어느 한 항의 ADC, 또는 제37항의 제약 조성물, 또는 이들의 조합을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 39

제25항 또는 제38항에 있어서, 암세포는 상동 DNA 수복 결함이 있는 것인 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상동 DNA 수복 결함은 BRCA1 돌연변이의 존재로 정의되는 것인 방법.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, 상동 DNA 수복 결함은 RAD51 병소 형성 분석에서 음의 점수로 정의되는 것인 방법.

청구항 42

B7-H4를 발현하는 종양의 부피를 감소시키는 방법으로서, 대상체에게 제1항 내지 제19항 또는 제24항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제20항의 제약 조성물, 제34항 내지 제37항 중 어느 한 항의 ADC, 제37항의 제약 조성물, 또는 이들의 조합을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 종양은 상동 DNA 수복 결함이 있는 것인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상동 DNA 수복 결함은 BRCA1 돌연변이의 존재로 정의되는 것인 방법.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서, 상동 DNA 수복 결함은 RAD51 병소 형성 분석에서 음의 점수로 정의되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 교차 참조
- [0002] 본 출원은 2020년 9월 11일자로 출원된 미국 가특허 출원 제63/077,207호의 우선권 이익을 주장하며, 이의 전문은 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다.
- [0003] 전자적으로 제출된 자료의 참조로서의 포함
- [0004] 본 출원과 동시에 제출되고 다음과 같이 확인되는 컴퓨터 판독 가능한 뉴클레오타이드/아미노산 서열 목록은 전체가 참조로 본원에 포함된다: 2021년 9월 8일 생성된 "B7H4-100-WO-PCT.txt"라는 명칭의 50,724 바이트의 아스키(ASCII) (텍스트) 파일.
- [0005] [기술분야]
- [0006] 본 발명은 암 치료를 위한 결합 분자(예를 들어, 항체) 및 관련 항체-약물 접합체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 잠재적인 항암제에 대한 수년간의 연구 및 개발에도 불구하고 암은 전 세계적으로 주요 질환 중 하나로 남아 있으며 3명 중 1명은 평생 동안 어떤 형태로든 암에 걸린다. 가장 흔한 암 유형 중 두 가지는 유방암과 폐암이다.

[0008] 암의 주된 치료법은 여전히 화학요법과 방사선요법이다. 그러나 이러한 치료법은 피로에서 병 및 탈모에 이르기까지 다양한 바람직하지 않은 부작용과 관련이 있다. 이러한 문제는 종종 사용되는 화학요법의 긴 과정으로 인해 악화된다.

[0009] 지난 이삼십 년간 암에 대한 수많은 항체 치료법이 개발 및 시판되어 여러 암 유형에 대한 가혹한 형태의 치료법(예를 들어, 수술 및 화학요법)에 대한 필요성이 감소했다. 이 기간 동안 항체(예를 들어, 단클론 항체)를 생산하는 방법론의 가용성은 크게 향상되었지만 임상적으로 이용 가능한 항암 항체는 상대적으로 적고 광범위한 암 유형을 표적으로 삼는 데 사용할 수 있는 항암 항체는 훨씬 더 적다. 또한, 치료용 항체의 효능을 증가시킬 필요가 있는데, 이는 일반적으로 표적 항원 및 항체 결합 후 암세포에 대한 후속 효과에 의해 제한된다.

[0010] 본 발명은 상기 언급된 문제들 중 하나 이상을 해결한다.

발명의 내용

[0011] 본 발명자들은 놀랍게도 막관통 폴리펩티드 B7-H4가 여러 세포 유형(예를 들어, 유방암, 폐암 및 췌장암)에서 고도로 발현되며, 이는 암 항원의 역할과 일치한다는 것을 발견했다. 본 발명자들은 시험관 내 및 생체 내 모두에서 B7-H4 발현 세포에 대해 높은(예를 들어, 상업적으로 이용 가능한 항체와 비교하여 보다 우수한 결합) 결합을 나타내는 항체를 성공적으로 생성하였다. 유리하게는, 항체는 B7-H4를 발현하는 다수의 상이한 암 세포 유형을 표적화할 수 있으며, 이는 항암 요법으로서 항체의 광범위한 유용성을 예시한다.

[0012] 또한, 항체는 (예를 들어, 항체-약물 접합체(ADC)를 제공하기 위해) 적합한 약물/세포독소에 유리하게 연결/접합될 수 있으며, 따라서 암세포에 대한 표적화된 독소 전달을 허용함으로써 치료법으로서 항체의 효능을 증가시킨다.

도면의 간단한 설명

[0013] 이제 본 발명의 실시 형태를 하기 도면 및 실시예를 참조하여 단지 예로서 설명한다.

도 1의 A 내지 D는 유방암에서 B7-H4 과발현을 보여준다. (A) TNBC(재치료); (B) HR+(치료 전); (C) HER2+(치료 전, 허셉틴 적격); (D) HER2+ve(허셉틴 치료됨).

도 2a 내지 2i는 종 교차 반응성 ELISA 분석 결과를 보여준다.

도 3a 내지 3g는 B7-H4 패밀리 구성원 및 상동체에 대한 클론 결합의 ELISA 분석 결과를 보여준다.

도 4의 A 및 B는 다양한 세포 유형에 대한 선택된 클론(및 상업적 항체)의 결합에 대한 세포 웨스턴 분석 결과를 보여준다. E= E Biosciences 14-5949 항-인간 B7H4 마우스 IgG; U= US biological B0000-35B 항 인간 B7H4 마우스 IgG; R= R and D systems AF2514 AF2514 항 마우스 B7H4 염소 IgG1; S= Sigma SAB2500141 항 B7H4 염소 IgG1

도 5a 내지 5f는 선택된 클론을 사용한 시험관 내 세포독성 분석 결과를 보여준다.

도 6은 인간, 시노물구스, 마우스 및 랫트 B7-H4에 대한 결합을 입증하는 클론 ZYOEQD_E02(및 이의 다수의 변이체)에 대해 수행된 ELISA 분석 결과를 보여준다.

도 7은 인간 B7-H4에 대한 E02_GL의 개선된 결합을 입증하는, 1D11과 비교하여 클론 E02_GL에 대해 수행된 ELISA 분석 결과를 보여준다.

도 8a 및 8b는 세포 상에 존재할 때 인간 B7-H4에 대한 E02_GL의 개선된 결합을 입증하는, 1D11과 비교하여 클론 E02_GL에 대해 수행된 유동 세포분석법의 분석 결과를 보여준다. HT29 세포에 대한 결과는 도 8a에 제시되어 있고 SKBR-3 세포에 대한 결과는 도 8b에 제시되어 있다. 기호 ◇는 'E02-GL 분획'을 나타내고 기호 □는 '1D11 분획'을 나타낸다. 기호 ●는 (음성) 대조군 'R347 분획'을 나타낸다.

도 9의 A 및 B는 E02-GL-SG3932 접합체로 처리한 후 인간 B7-H4 형질감염된(및 형질감염되지 않은 대조군) Ad293 세포의 세포독성을 보여준다. 열린 원 = 이소형 대조군 ADC(예를 들어, NIP228-SG3932); 채워진 원 = E02-GL-SG3932.

도 10a 및 10b는 시험관 내에서 종양 세포의 방관자 사멸을 보여준다(E02-GL-SG3932).

도 11은 생체 내에서 종양 세포의 방관자 사멸을 보여준다(E02-GL-SG3932).

도 12는 E02-GL-SG3932가 환자 유래 이중이식편(PDX) 모델에서 강력한 생체 내 활성을 가짐을 보여준다. 열린 원 = 비히클 단독 대조군; 채워진 원 = E02-GL-SG3932(7 mg/kg).

도 13은 7 mg/kg으로 단일 i.v. 후 PDX 모델에서 E02-GL-SG3932의 항종양 활성을 보여준다.

도 14a 및 14b는 시험관 내 및 생체 내에서 MX-1 세포에서(14a); 및 시험관 내 및 생체 내에서 HT29 유래 모델에서(14b), E02-GL-topo I 억제제 ADC가 유사한 효능을 가짐을 보여준다.

도 15의 A 및 B는 E02-GL-SG3249 접합체로 처리한 후 시노물구스 B7-H4 형질감염된(및 형질감염되지 않은 대조군) HEK293 세포의 세포독성을 보여준다.

도 16의 A 내지 C는 살아있는 세포에서 결합된 E02-GL-항원 복합체의 내재화를 입증하는 내재화 실험의 결과를 보여준다.

도 17a 및 17b는 E02-GL-SG3932 처리가 시험관 내에서 이중 가닥 DNA 절단을 초래함을 입증하는 웨스턴 블롯 분석을 보여준다; (도 17c)는 HCC1569 세포를 SG3249, 보다 구체적으로 E02-GL-SG3249에 접합된 항-B7-H4 항체로 처리한 후 주요 이중 가닥 절단 마커의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다.

도 18은 E02-GL-SG3249 처리 후 SKBR3 세포에서의 카스파제 3/7 활성을 보여준다.

도 19는 종양 세포에 대한 E02-GL-SG3249 및 Warhead SG3199의 시험관 내 활성을 보여준다.

도 20의 A 내지 D는 시험관 내에서 종양 세포의 방관자 사멸을 보여준다(E02-GL-SG3249).

도 21의 A 내지 C는 E02-GL ADC가 1D11 ADC와 비교하여 개선된 세포독성/효능을 가짐을 보여준다. 비교 세포독성이 인간 B7-H4를 발현하는 HT29 세포주(A), SKBR3 세포주(B) 및 HCC1569 세포주(C)에 대해 제시되어 있다.

도 22의 A 내지 C는 (A) OVCAR4 세포(시스플라틴 불응성 난소암, 높은 B7-H4), (B) HCC1569 세포(HER2+ 유방암, B7-H4의 이중 발현) 및 (C) MDA-MB-468 세포(삼중 음성 유방암, 낮은 B7-H4 발현)의 종양 이식편에 대한 E02-GL-SG3249의 생체 내 활성을 보여준다.

도 23은 생체 내에서 종양 세포의 방관자 사멸을 보여준다.

도 24a 내지 24o는 E02-GL-SG3249가 환자 유래 이중이식편(PDX) 모델에서 강력한 생체 내 활성을 가짐을 보여준다. 원 = 비히클 단독 대조군; 사각형 = E02-GL-SG3249(0.3 mg/kg); 삼각형 = E02-GL-SG3249(1.0 mg/kg).

도 25의 A 및 B는 (B) (관심 조직 영역 내의) mm²당 감마-H2AX 양성 세포의 수로 정량화된, (A) HCC1954 종양 이중이식편의 감마-H2AX 면역조직화학(IHC)의 결과(E02-GL-SG3249 유무)를 보여준다. HALO 소프트웨어(CRO-OracleBio 포함)를 사용하여 수행된 이미지 분석. 감마-H2AX 양성 종양 세포의 증가된 수는 E02-GL-SG3249 처리 후 최대 10일까지 관찰되었다.

도 26의 A 내지 D는 B7H4 발현 종양(HT29 세포)에서 B7-H4 Ab의 보유를 보여준다. 강도 척도는 Epi-형광 강도를 보여준다. 방사 효율 = (p/sec/cm²/sr)/(μW/cm²); 강도 척도, 최소=1.20e8, 최대 = 1.50e9.

도 27의 A 내지 D는 B7H4 발현 종양(CT26 세포)에서 B7-H4 Ab의 보유를 보여준다. 강도 척도는 Epi-형광 강도를 보여준다. 방사 효율 = (p/sec/cm²/sr)/(μW/cm²); 강도 척도, 최소=1.20e8, 최대 = 1.50e9.

도 28의 A 및 B는 5개의 예시적인 항체 클론의 서열 정렬을 보여준다.

도 29a는 B7-H4를 표적으로 하는 TOP1i-ADC의 개략도이다. 도 29b는 B7-H4를 표적으로 하는 TOP1i-ADC E02-GL-SG3249의 주요 특징을 보여준다.

도 30은 정상 인간 및 정상 시노물구스 원숭이 유방, 췌장, 자궁경부, 자궁내막, 나팔관/난관 및 신장 조직에서 B7-H4 발현의 대표적인 면역조직화학 염색의 예시 이미지를 보여준다.

도 31은 유방(TNBC 및 ER+, 개별 도 1의 A 및 B 참조), 담관암종, NSCLC-SCC, 자궁내막 종양 및 난소 종양을 포함하는 인간 종양 조직에서 B7-H4 발현의 대표적인 면역조직화학 염색의 예시 이미지를 보여준다.

도 32는 B7-H4 오르소로그 정렬이다.

도 33은 DELFIA-ELISA 방법 및 항-인간 IgG(H+L)에 의한 인간 B7 H4에 대한 항체 중간체 E02-INT 및 E02-GL-SG3932의 결합을 보여준다. E02-INT: E02-GL-SG3932의 항체 중간체; NIP228: 이소형 일치 대조군; huB7-H4: 제

조합 인간 B7-H4.

도 34는 인간, 무린 또는 시노물구스 원숭이 B7-H4를 안정적으로 발현하는 HEK 293 세포에 대한 항체 중간체 E02-INT의 결합을 보여준다. E02-INT: E02-GL-SG3932의 항체 중간체; HEK293 JI TREX: 형질도입되지 않은 HEK293 JI TREX 세포; HEK293 JI TREX cynoB7-H4: 시노물구스 원숭이 B7-H4를 안정적으로 발현하는 HEK 293 세포; HEK293 JI TREX huB7-H4: 인간 B7-H4를 안정적으로 발현하는 HEK 293 세포; HEK293 JI TREX muB7-H4: 무린 B7-H4를 안정적으로 발현하는 HEK 293 세포; MF1: 평균 형광 강도. y축은 평균 형광 강도 기하 평균이다. 데이터는 3회 반복(triplicate) 결정의 평균 $\pm$ SD로 표시된다.

도 35는 인간 유방암 세포주 및 인간 B7-H4를 안정적으로 발현하는 HT29 세포에 대한 항체 중간체 E02-INT 및 E02-GL-SG3932의 결합을 보여준다. E02-INT: E02-GL-SG3932의 항체 중간체; HT29-huB7-H4 클론 4 및 HT29-huB7-H4 클론 26: 인간 B7-H4를 안정적으로 발현하는 HT29 세포; MF1: 평균 형광 강도. y축은 평균 형광 강도 기하 평균이다.

도 36의 A 내지 C는 세포주 HT29, HT29-huB7-H4 클론 26 및 MX-1에서 E02-GL-SG3932의 시험관 내 세포독성 활성을 보여준다. 데이터는 3회 반복(triplicate) 결정의 평균 $\pm$ SD로 표시된다.

도 37는 E02-GL-SG3932의 시험관 내 항체 의존적 세포 매개성 세포독성 활성을 보여준다. 그래프는 6개 실험의 평균 배수 변화 $\pm$ SEM을 표시한다.

도 38는 이미지 시퀀스로 제시된 E02-INT 내재화의 시간 경과를 보여준다. 인간 결장암 세포 HT29-huB7-H4 클론 26(첫 번째 행) 및 인간 유방암 세포 MX-1(두 번째 행)은 Alexa Fluor™ 568(적색)과 접합된 5 μ g/mL E02-INT로 표지되었다. 축척 막대는 20 μ m이다.

도 39a 내지 39c는 인간 암 세포주 HT29-huB7-H4 클론 26 및 MX-1에서 E02-INT 내재화의 생세포 이미징을 보여준다. (39a) 각 점은 480분 동안 10분 간격으로 3개의 독립적인 웰의 평균 내재화 백분율 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. (39b) 8시간 후 내재화 백분율 및 (39c) 3개의 독립적인 웰로부터의 예상 반감기가 제시되어 있다. 이러한 값은 헤리 - 1상 지수 감쇠 방정식을 사용하여 도출되었다. 수평 막대는 그룹 내 산술 평균을 나타낸다; 통계적 유의성은 일원 ANOVA, Tukeys 다중 비교 검정으로 평가되었다. ns: 유의하지 않음, $p > 0.05$; ** $p < 0.05$.

도 40의 A 및 B는 항체 E02-INT가 HT29-huB7-H4 클론 26 세포에서 리소솜과 함께 공동 편재화됨을 보여준다. (A) HT29-huB7-H4 클론 26 세포를 Alexa Fluor™ 568 항체와 접합된 5 μ g/mL E02-INT와 함께 24시간 동안 인큐베이션하였다[(A) 적색 - 상단 및 하단 좌측]. 리소솜은 마우스 항-인간 LAMP1-Alexa Fluor™ 488 항체로 염색되었다[(A) 녹색 - 상단 중간]. 엔도솜은 토끼 항-인간 EEA1 항체로 염색되었고 염소 항-토끼 IgG1-DyLight™ 650으로 검출되었다[(A) 녹색 - 하단 중간]. E02-INT와 LAMP1 또는 EEA1의 공동 편재화가 병합된 이미지에 제시되어 있다. (B) Zeiss Zen 소프트웨어를 사용하여 Pearson의 상관 계수로 분석된 EEA1 및 LAMP1과 E02-INT의 공동 편재화. 각 점은 단일 셀 측정을 나타낸다. 통계적 유의성은 일원 ANOVA, Tukeys 다중 비교 검정으로 평가되었다. ns: 유의하지 않음, $p > 0.05$; **** $p < 0.0001$.

도 41는 E02-GL-SG3932 또는 TOP1i warhead SG3924로 처리된 MX-1 세포에서 DNA 손상 반응 신호전달을 보여주는 겔 사진이다. 제시된 데이터는 n: 2개 실험을 대표한다.

도 42는 E02-GL-SG3932 또는 TOP1i Warhead SG3924로 처리된 HT29-huB7-H4 세포에서 DNA 손상 반응 신호전달을 보여주는 겔 사진이다. 제시된 데이터는 n: 2개 실험을 대표한다.

도 43의 A 내지 F는 E02-GL-SG3932로 처리한 후 HT29-huB7-H4 클론 26 이중이식 종양에서의 인간 IgG, γ H2AX 및 절단된 카스파제 3의 면역조직화학(IHC) 염색 이미지이다. 이미지는 7 mg/kg E02-GL-SG3932(43의 D 내지 F) 또는 이소형 일치 대조군 ADC NIP228-SG3932(43의 A 내지 C)의 단일 IV 투여 후 168시간에서의 HT29-huB7-H4 클론 26 종양 이중이식편 모델에서의 인간 IgG, γ H2AX 및 절단된 카스파제-3에 대한 IHC 염색을 대표한다.

도 44의 A 내지 D는 HT29 huB7 H4 클론 26 이중이식편 연구에서 모든 시점 및 처리에 걸친 인간 IgG, γ H2AX 및 절단된 카스파제-3 IHC 염색의 이미지 분석 데이터를 보여준다. 상단 패널(44의 A): 시간 경과에 따른 모든 상피 세포로부터 인간 IgG-양성 상피 세포의 분획의 변화를 보여주는 상피 세포 분석. 두 번째 패널(44의 B): γ H2AX 분석법에서 병소에 대해 양성으로 발견된 상피 세포의 분획을 보여주는 γ H2AX 분석. 세 번째 패널(44의 C): 시간 경과에 따른 샘플의 절단된 카스파제-3-양성 종양 세포의 백분율을 보여주는 절단된 카스파제 3(CC-3). 하단 패널(44의 D): 이소형 일치 대조군 ADC NIP228-SG3932와 비교하여 E02-GL-SG3932 처리로 인한 세포

사멸을 보여주는, 시간 경과에 따른 샘플의 모든 상피 세포의 세포 밀도.

도 45의 A 및 B는 B7-H4 음성 HT29 이종이식편 모델에서 E02-GL-SG3932 효능을 보여준다(또한 도 11 참조). 값은 n: 그룹당 8마리 동물에 대한 평균 $\pm$ SEM 중앙 부피이다. 점선은 투약일을 나타낸다.

도 46a 내지 46c는 HT29-huB7-H4 클론 26 이종이식편 모델에서 E02-GL-SG3932 효능을 보여준다. 값은 n: 그룹당 10 또는 8마리 동물에 대한 평균 $\pm$ SEM 중앙 부피이다. 점선은 투약일을 나타낸다.

도 47의 A 및 B는 MX-1 이종이식편 모델에서 E02-GL-SG3932, NIP228-SG3932 및 E02-INT의 효능을 보여준다. 값은 n: 그룹당 8마리 동물에 대한 평균 $\pm$ SEM 중앙 부피이다. 점선은 투약일을 나타낸다.

도 48은 MX-1 이종이식편 모델에서 E02-GL-SG3932 및 NIP228-SG3932의 효능을 보여준다. 값은 n: 그룹당 3 또는 6마리 동물에 대한 평균 $\pm$ SEM 중앙 부피이다.

도 49는 MDA-MB-468 이종이식편 모델에서 E02-GL-SG3932 및 NIP228-SG3932의 효능을 보여준다. 값은 n: 그룹당 3 또는 6마리 동물에 대한 평균 $\pm$ SEM 중앙 부피이다.

도 50은 세포막 OD 평균값의 평균의 사례 평균으로 분류한 환자 유래 이종이식편(PDX) 모델에서 정량적 이미지 분석 B7-H4 발현 데이터를 보여준다. 발현은 IHC 세포 강도 등급으로 암호화된 색이다(음성: 검은색, 1+: 흰색, 2+: 연회색, 3+: 진회색).

도 51은 환자 유래 이종이식편 모델에서 1.25 mg/kg E02-GL-SG3932 또는 NIP228-SG3932의 단일 투여로 인한 항종양 활성을 보여준다.

도 52a 및 52b는 1.25 mg/kg 용량 수준에서 E02-GL-SG3932 또는 NIP228-SG3932에 대한 종양 반응에 따라 분류된 PDX 모델에서의 B7-H4 발현을 보여준다. 모델은 기준선으로부터 종양 부피의 백분율 변화가 -30% 내지 -100%(경계 포함)인 경우 테스트제에 대해 반응성(R)인 것으로 간주되었다. 모델은 기준선으로부터 종양 부피의 백분율 변화가 -30%보다 큰 경우 비반응자(NR)로 간주되었다. y축은 H 점수로 결정한 각 모델의 B7-H4 수준을 나타낸다.

도 53a은 환자 유래 이종이식편 모델에서 3.5 mg/kg E02-GL-SG3932 또는 NIP228-SG3932의 단일 투여로 인한 항종양 활성을 보여준다. **도 53b 내지 53e**는 (A) 1.25 mg/kg E02-GL-SG3932, (B) 3.5 mg/kg에서 E02-GL-SG3932, (C) 1.25 mg/kg 이소형 대조군 ADC 및 (D) 3.5 mg/kg 이소형 대조군 ADC에서 E02-GL-SG3932 투여, B7-H4 발현 수준 및 HR 결핍의 상관관계를 결정하기 위한 연구 프로토콜의 결과를 보여준다. **도 53b 내지 53e**에서, 삼각형 "△" 기호는 상동 재조합이 결여된 모델을 표시한다(BRCA 돌연변이 또는 RAD51 병소 분석에 의해 결정됨). 원 "●" 기호는 상동 재조합 결함이 없는 모델을 표시한다.

도 54의 A 및 B는 3.5 mg/kg 용량 수준에서 E02-GL-SG3932 또는 NIP228-SG3932에 대한 종양 반응에 따라 분류된 PDX 모델에서의 B7-H4 발현을 보여준다. 모델은 기준선으로부터 종양 부피의 백분율 변화가 -30% 내지 -100%(경계 포함)인 경우 테스트제에 대해 반응성(R)인 것으로 간주되었다. 모델은 기준선으로부터 종양 부피의 백분율 변화가 -30%보다 큰 경우 NR인 것으로 간주되었다. y축은 H 점수로 결정한 각 모델의 B7 H4 수준을 나타낸다.

도 55a 내지 55g는 처리되지 않은 마우스와 비교하여 1.25 mg/kg 또는 3.5 mg/kg의 단일 용량의 E02-GL-SG3932로 처리된 담관암종 PDX 마우스 모델의 제1 패널에 대한 시간 경과에 따른 평균 종양 부피를 보여준다.

도 56a 내지 56k는 처리되지 않은 마우스와 비교하여 1.25 mg/kg 또는 3.5 mg/kg의 단일 용량의 E02-GL-SG3932로 처리된 담관암종 PDX 마우스 모델의 제2 패널에 대한 시간 경과에 따른 평균 종양 부피를 보여준다.

도 57의 A 및 B는 절단 가능한 mal-PEG8-val-ala 링커-warhead로 제조된 ADC가 ADC 2 내지 4와 비교하여 생체 내에서 가장 활성임을 보여준다. **도 57의 A**는 **도 57의 B**의 핵심이다.

도 58은 절단 가능한 mal-PEG8-val-ala 링커-warhead ADC가 ADC 2 내지 4와 비교하여 랫트 독성 연구에서 가장 깨끗한 안전성 프로파일을 나타냄을 보여준다.

도 59의 A 및 B는 절단 가능한 mal-PEG8-val-ala 링커-warhead ADC가 ADC 2 내지 4와 비교하여 양호한 PK 특성 및 가장 넓은 상대 TI를 가짐을 보여준다. 상대 TI = 종양 정제(MX-1 모델)를 제공하는 AUC에 대한 랫트에서 테스트한 최고 용량(HNSTD가 아닌 NOAEL)에서의 AUC의 노출 비율. **도 59의 A**는 **도 59의 B**의 핵심이다.

도 60a 및 60b는 E02-GL-SG3932가 유방 및 난소 PDX 마우스 모델에서 강력한 활성을 가짐을 보여준다.

도 61은 E02-GL-SG3932가 HR-결핍 종양 및 상승된 B7-H4를 갖는 HR-능숙(proficient) 종양에서 강력한 활성을 가짐을 보여준다.

도 62a 및 62b는 3.5 mg/kg 용량 수준에서 E02-GL-SG3932에 대한 종양 반응에 따라 분류된 (62a) HR-결함 및 (62b) HR-능숙 PDX 모델에서의 종양 반응을 보여준다. (R)은 모델이 테스트체에 반응하는 것으로 간주되었음을 나타낸다. (NR)은 모델이 비반응자로 간주되었음을 나타낸다. y축은 H 점수로 결정한 각 모델의 B7-H4 수준을 나타낸다.

도 62c 및 62d는 1.25 mg/kg 용량 수준에서 E02-GL-SG3932에 대한 종양 반응에 따라 분류된 (62c) HR-결함 및 (62d) HR-능숙 PDX 모델에서의 종양 반응을 보여준다. (R)은 모델이 테스트체에 반응하는 것으로 간주되었음을 나타낸다. (NR)은 모델이 비반응자로 간주되었음을 나타낸다. y축은 H 점수로 결정한 각 모델의 B7-H4 수준을 나타낸다.

도 63은 DLD1 wt 또는 BRCA2-/- 세포에서의 상이한 warhead의 6일 세포독성 분석 결과를 보여준다. MMAE = 음성 대조군, 미세소관 억제제 warhead.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 따라서, 일 양태에서 본 발명은 B7-H4(예를 들어, B7-H4 에피토프)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하며, 이 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0015] i. 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1(HCDR1), 중쇄 CDR2(HCDR2), 중쇄 CDR3(HCDR3), 경쇄 CDR1(LCDR1), 경쇄 CDR2(LCDR2) 및 경쇄 CDR3(LCDR3), 또는 이의 기능적 변이체;
- [0016] ii. 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0017] iii. 각각 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0018] iv. 각각 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체; 또는
- [0019] v. 각각 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0020] 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 제약 조성물 내에, 예를 들어 환자에게 투여하기에 적합한 제형 내에 적합하게 포함될 수 있다.
- [0021] 또 다른 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제약 조성물이 제공되며, 이 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0022] i. 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1(HCDR1), 중쇄 CDR2(HCDR2), 중쇄 CDR3(HCDR3), 경쇄 CDR1(LCDR1), 경쇄 CDR2(LCDR2) 및 경쇄 CDR3(LCDR3), 또는 이의 기능적 변이체;
- [0023] ii. 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0024] iii. 각각 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0025] iv. 각각 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체; 또는
- [0026] v. 각각 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0027] 용어 "제약 조성물"은 활성 성분의 생물학적 활성이 유효하도록 하는 형태로 존재하고, 조성물이 투여될 대상체에 허용 불가능하게 독성을 나타내는 추가적인 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 이러한 조성물은 멸균

조성물일 수 있고, 제약상 허용 가능한 담체, 예컨대, 생리 식염수를 포함할 수 있다. 적합한 제약 조성물은 완충액(예컨대, 아세트산염, 인산염, 또는 시트르산염 완충액), 계면활성제(예컨대, 폴리소르베이트), 안정화제(예컨대, 인간 알부민), 보존제(예컨대, 벤질 알코올) 및 생물학적 이용가능성을 증진시키는 흡수 촉진제 및/또는 기타 통상적인 가용화제 또는 분산제 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

- [0028] 또한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 생체 내에서 B7-H4 양성 종양의 성장을 표적화하고 억제하는 것으로 입증되었다. 따라서, 본 발명은 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 상기 정의된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 상기 정의된 제약 조성물을 포함한다. 바람직하게는, 상기 암은 B7-H4를 발현하는 암 세포를 포함한다.
- [0029] 일 양태에서 암(예를 들어, 상기 암은 B7-H4를 발현하는 암 세포를 포함함)을 치료하는 데 사용하기 위한 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되며, 항체 또는 항원 결합 단편은
- [0030] i. 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1(HCDR1), 중쇄 CDR2(HCDR2), 중쇄 CDR3(HCDR3), 경쇄 CDR1(LCDR1), 경쇄 CDR2(LCDR2) 및 경쇄 CDR3(LCDR3), 또는 이의 기능적 변이체;
- [0031] ii. 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0032] iii. 각각 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0033] iv. 각각 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체; 또는
- [0034] v. 각각 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0035] 즉, 본 발명의 일 양태는 암(예를 들어, 상기 암은 B7-H4를 발현하는 암 세포를 포함함)을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 유효량의 항체 또는 항원 결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 항체 또는 항원 결합 단편은
- [0036] i. 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1(HCDR1), 중쇄 CDR2(HCDR2), 중쇄 CDR3(HCDR3), 경쇄 CDR1(LCDR1), 경쇄 CDR2(LCDR2) 및 경쇄 CDR3(LCDR3), 또는 이의 기능적 변이체;
- [0037] ii. 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0038] iii. 각각 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0039] iv. 각각 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체; 또는
- [0040] v. 각각 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0041] 다시 말해, 본 발명은 또 다른 양태에서 암(예를 들어, 상기 암은 B7-H4를 발현하는 암 세포를 포함함) 치료용 의약의 제조에 있어서 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도를 포함하고, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은
- [0042] i. 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1(HCDR1), 중쇄 CDR2(HCDR2), 중쇄 CDR3(HCDR3), 경쇄 CDR1(LCDR1), 경쇄 CDR2(LCDR2) 및 경쇄 CDR3(LCDR3), 또는 이의 기능적 변이체;
- [0043] ii. 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0044] iii. 각각 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18의 아미노산 서열

을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;

- [0045] iv. 각각 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체; 또는
- [0046] v. 각각 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0047] 특정 정의 및 바람직한 실시 형태가 이제 개략적으로 설명될 것이다. 다음의 정의 및 실시 형태는 본원에 기재된 임의의 양태, 예를 들어, 임의의 방법, 조성물, 및/또는 본원에 기재된 치료법에 사용하기 위한 조성물에 관한 것일 수 있음을 이해해야 한다.
- [0048] 용어 "에피토프"는 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편에 결합할 수 있는(예를 들어, 이에 의해 결합될 수 있는) 표적 단백질 영역(예를 들어, 폴리펩티드)을 지칭한다.
- [0049] B7-H4(V-세트 도메인 함유 T 세포 활성화 억제제 1로도 알려짐, *VTN1* 유전자에 의해 암호화됨)는 공동자극 단백질의 B7 패밀리의 막관통 폴리펩티드이다. B7-H4는 면역 세포의 리간드(예를 들어, CD28이 잠재적인 리간드인 T 림프구)와의 상호작용을 위해 항원 제시 세포의 표면에서 발현되는 것으로 이해된다. 이론에 구애됨을 바라지 않고, B7-H4가 다양한 암 유형의 세포에서 고도로 발현된다는 본 발명자들의 관찰은 이 분자가 종양 관련 항원임을 시사한다. 이와 같이, 청구된 항체가 B7-H4 발현을 표적화(및 선택적으로 세포독소를 전달)하는 능력은 상기 항체를 암 치료법에 사용하기에 특히 적합하게 만든다. 또한, B7-H4 발현은 특정 암 유형에 제한되지 않으므로, 이는 광범위한 암 유형을 치료하기 위한 표적 항원을 나타낸다.
- [0050] B7-H4의 RNA, DNA 및 아미노산 서열은 당업자에게 공지되어 있으며, 여러 데이터베이스, 예를 들어, 미국 국립 생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI) 및 UniProt의 데이터베이스에서 찾아볼 수 있다. UniProt에서 발견되는 이러한 서열의 예는 인간 B7-H4의 경우 Q7Z7D3(VTCN1_HUMAN)이고, 마우스 B7-H4의 경우 Q7TSP5 (VTCN1_MOUSE)이다. 인간 B7-H4를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 53, 더욱 바람직하게는 서열번호 54일 수 있다. 인간 B7-H4의 폴리펩티드 서열은 바람직하게는 서열번호 55이다.
- [0051] 일 실시 형태에서, 항체 및 이의 항원 결합 단편은 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 상기 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본원에서 "ZY0EPQ-E02" 또는 "EPQ-E02"로 지칭될 수 있다.
- [0052] 일 실시 형태에서, 항체 및 이의 항원 결합 단편은 각각 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 상기 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본원에서 "ZY0EOB-F05" 또는 "EOB-F05"로 지칭될 수 있다.
- [0053] 일 실시 형태에서, 항체 및 이의 항원 결합 단편은 각각 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 상기 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본원에서 "ZY0E05-E07" 또는 "E05-E07"로 지칭될 수 있다.
- [0054] 일 실시 형태에서, 항체 및 이의 항원 결합 단편은 각각 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 상기 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본원에서 "ZY0EP0-C07" 또는 "EP0-C07"로 지칭될 수 있다.
- [0055] 특히 바람직한 실시 형태에서, 항체 및 이의 항원 결합 단편은 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 상기 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 "ZY0EQD-E02" 또는 "EQD-E02"로 지칭될 수 있다.
- [0056] 즉, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 바람직하게는
- [0057] - 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0058] - 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 또는 이의 기능적 변이체;

- [0059] - 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0060] - 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0061] - 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 또는 이의 기능적 변이체; 및
- [0062] - 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함할 수 있다.
- [0063] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0064] i. 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0065] ii. 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0066] iii. 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0067] iv. 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0068] v. 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 또는 이의 기능적 변이체; 및
- [0069] vi. 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0070] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0071] i. 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0072] ii. 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0073] iii. 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0074] iv. 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0075] v. 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 또는 이의 기능적 변이체; 및
- [0076] vi. 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0077] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0078] i. 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0079] ii. 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0080] iii. 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0081] iv. 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0082] v. 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 또는 이의 기능적 변이체; 및
- [0083] vi. 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0084] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0085] i. 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0086] ii. 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0087] iii. 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0088] iv. 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0089] v. 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 또는 이의 기능적 변이체; 및
- [0090] vi. 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0091] 추가로 또는 대안적으로, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 이의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)에 의해 기재될 수 있다.
- [0092] (항체 또는 이의 항원 결합 단편이 포함할 수 있는) 적합한 가변 중쇄(VH) 서열은 아래에 개별화된 방식으로 요약되어 있다:

- [0093] - 서열번호 31, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0094] - 서열번호 33, 또는 이의 기능적 변이체
- [0095] - 서열번호 43, 또는 이의 기능적 변이체
- [0096] - 서열번호 45, 또는 이의 기능적 변이체
- [0097] - 서열번호 46, 또는 이의 기능적 변이체
- [0098] - 서열번호 47, 또는 이의 기능적 변이체
- [0099] - 서열번호 35, 또는 이의 기능적 변이체
- [0100] - 서열번호 37, 또는 이의 기능적 변이체
- [0101] - 서열번호 39, 또는 이의 기능적 변이체
- [0102] (항체 또는 이의 항원 결합 단편이 포함할 수 있는) 특히 적합한 가변 중쇄(VH) 서열은 아래에 개별화된 방식으로 요약되어 있다:
- [0103] - 서열번호 45, 또는 이의 기능적 변이체
- [0104] - 서열번호 33, 또는 이의 기능적 변이체
- [0105] - 서열번호 43, 또는 이의 기능적 변이체
- [0106] - 서열번호 46, 또는 이의 기능적 변이체
- [0107] - 서열번호 47, 또는 이의 기능적 변이체
- [0108] (항체 또는 이의 항원 결합 단편이 포함할 수 있는) 적합한 가변 경쇄(VL) 서열은 아래에 개별화된 방식으로 요약되어 있다:
- [0109] - 서열번호 32, 또는 이의 기능적 변이체
- [0110] - 서열번호 34, 또는 이의 기능적 변이체
- [0111] - 서열번호 36, 또는 이의 기능적 변이체
- [0112] - 서열번호 38, 또는 이의 기능적 변이체
- [0113] - 서열번호 40, 또는 이의 기능적 변이체
- [0114] (항체 또는 이의 항원 결합 단편이 포함할 수 있는) 바람직한 가변 경쇄(VL) 서열은 서열번호 34의 아미노산 서열(또는 이의 기능적 변이체)을 포함할 수 있다.
- [0115] 예를 들어, 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0116] i. 서열번호 31, 33, 35, 37, 또는 39의 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및
- [0117] ii. 서열번호 32, 34, 36, 38, 또는 40의 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0118] 예를 들어, 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0119] i. 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 43, 45, 46, 또는 47의 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및
- [0120] ii. 서열번호 32, 34, 36, 38, 또는 40의 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0121] 적합하게는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0122] i. 서열번호 33의 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및

- [0123] ii. 서열번호 34의 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함할 수 있다.
- [0124] 더욱 적합하게는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0125] i. 서열번호 45의 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및
- [0126] ii. 서열번호 34의 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함할 수 있다.
- [0127] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은
- [0128] - 각각 서열번호 31 및 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL), 또는 이의 기능적 변이체;
- [0129] - 각각 서열번호 33 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0130] - 각각 서열번호 43 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0131] - 각각 서열번호 45 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0132] - 각각 서열번호 46 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0133] - 각각 서열번호 47 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0134] - 각각 서열번호 35 및 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0135] - 각각 서열번호 37 및 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체; 또는
- [0136] - 각각 서열번호 39 및 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0137] 바람직한 실시 형태에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 45, 33, 43, 46 또는 47의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄(VH)(또는 이의 기능적 변이체); 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄(VL)(또는 이의 기능적 변이체)를 포함한다. 예를 들어, 서열번호 33, 45, 46 및/ 47의 VH는 서열번호 33의 VH의 "생식세포화(germlined)" 버전에 상응할 수 있다(예를 들어, 모두 동일한 CDR 서열을 갖지만 프레임워크 변형이 있음). 유리하게도, 각각의 변이체는 동등한 결합 특성을 보유한다.
- [0138] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 상기 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 "ZY0EPD-E02" 또는 "EPD-E02"로 지칭될 수 있다.
- [0139] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 상기 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 "ZY0EOB-F05" 또는 "EOB-F05"로 지칭될 수 있다.
- [0140] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 상기 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 "ZY0E05-E07" 또는 "E05-E07"로 지칭될 수 있다.
- [0141] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 상기 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 "ZY0EP0-C07" 또는 "EP0-C07"로 지칭될 수 있다.
- [0142] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 상기 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 "ZY0EQD-E02" 또는 "EQD-E02"로 지칭될 수 있다.
- [0143] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.

- [0144] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0145] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0146] 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 상기 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 "EQD-E02_GL"로 지칭될 수 있다.
- [0147] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 43의 기준 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄를 포함한다. 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄를 포함한다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄를 포함할 수 있다.
- [0148] 추가로 또는 대안적으로, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 이의 중쇄 및 경쇄에 의해 기재될 수 있다.
- [0149] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 44의 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, VL 및 불변 경쇄를 포함하는) 경쇄를 포함한다. 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, VL 및 불변 경쇄를 포함하는) 경쇄를 포함한다.
- [0150] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 48의 기준 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, VH 및 불변 중쇄를 포함하는) 중쇄를 포함한다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, VH 및 불변 중쇄를 포함하는) 중쇄를 포함할 수 있다. 이러한 중쇄는 "E02-GL-Maia-중쇄"로 지칭될 수 있다.
- [0151] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 49의 기준 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, VH 및 불변 중쇄를 포함하는) 중쇄를 포함한다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, VH 및 불변 중쇄를 포함하는) 중쇄를 포함할 수 있다. 이러한 중쇄는 "E02-GLY-Maia-중쇄"로 지칭될 수 있다.
- [0152] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 50의 기준 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, VH 및 불변 중쇄를 포함하는) 중쇄를 포함한다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, VH 및 불변 중쇄를 포함하는) 중쇄를 포함할 수 있다. 이러한 중쇄는 "E02-GLQ-Maia-중쇄"로 지칭될 수 있다.
- [0153] 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 51의 기준 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, VH 및 불변 중쇄를 포함하는) 중쇄를 포함한다. 더욱 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, VH 및 불변 중쇄를 포함하는) 중쇄를 포함한다. 이러한 중쇄는 "E02-GL-WT-중쇄"로 지칭될 수 있다.
- [0154] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 42의 기준 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0155] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는

중쇄 불변 영역을 포함한다.

- [0156] 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, VL 및 불변 경쇄를 포함하는) 경쇄 및 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, VH 및 불변 중쇄를 포함하는) 중쇄를 포함한다.
- [0157] 유리하게는, 본 발명자들은 청구범위의 항체 또는 항원 결합 단편이 B7-H4를 표적으로 하는 것으로 보고된 기존의 (상업적으로) 입수 가능한 항체와 비교할 때 더 넓은 범위의 B7-H4 발현 세포를 표적으로 할 수 있음을 입증하였다. 따라서, 본 발명자들은 임상적으로 관련된 표적에 대한 친화도 및 특이성을 갖는 이의 항체(또는 항원 결합 단편)를 제공했을 뿐만 아니라 이와 관련된 독특한 이점(예를 들어, 예상치 못한 기술적 효과)을 입증하였다.
- [0158] 예를 들어, 도 4는 청구범위의 예시적인 항체가 다음의 항체로는 달성할 수 없는 친화도로 광범위한 암 세포 유형에 결합함을 입증한다: Biosciences 14-5949 항-인간 B7H4 마우스 IgG; US biological B0000-35B 항 인간 B7H4 마우스 IgG; R and D systems AF2514 항 마우스 B7H4 염소 IgG1; 및 Sigma SAB2500141 항 B7H4 염소 IgG1.
- [0159] 바람직하게는, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 암 세포의 필수 구성요소로서 B7-H4(예를 들어, 암 세포의 세포막의 필수 구성요소로서 B7-H4)에 결합할 수 있다.
- [0160] 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 OVCAR4 세포주 및/또는 CHO 세포주(예를 들어, B7-H4를 암호화하는 외인성 핵산이 결합될 수 있음)에 결합할 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 OVCAR4 세포주 및/또는 CHO 세포주(예를 들어, B7-H4를 암호화하는 외인성 핵산이 결합될 수 있음)의 B7-H4(예를 들어, B7-H4 에피토프)에 결합한다. 적합하게는, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 OVCAR4 세포주 및 CHO 세포주(예를 들어, B7-H4를 암호화하는 외인성 핵산이 결합될 수 있음)에 결합할 수 있다.
- [0161] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 E Biosciences 14-5949 항-인간 B7H4 마우스 IgG, US biological B0000-35B 항 인간 B7H4 마우스 IgG, R and D systems AF2514 항-마우스 B7H4 염소 IgG1, Sigma SAB2500141 항 B7H4 염소 IgG1, 이소형 1 CAT004 SP06-003, 이소형 2 R and D 정상 염소 IgG 대조군(AB-108C), AdD serotec MCA2632, Epitomics 2516-1, eBiosciences, 145972-82, eBioscience 145970-85, 또는 이의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 항체와 비교할 때 더 높은 친화도로 OVCAR4 세포주 및/또는 CHO 세포주(예를 들어, B7-H4를 암호화하는 외인성 핵산이 결합될 수 있음)에 결합한다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 E Biosciences 14-5949 항-인간 B7H4 마우스 IgG, US biological B0000-35B 항 인간 B7H4 마우스 IgG, R and D systems AF2514 항-마우스 B7H4 염소 IgG1 및 Sigma SAB2500141 항 B7H4 염소 IgG1, 또는 이의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 항체와 비교할 때 더 높은 친화도로 OVCAR4 세포주 및/또는 CHO 세포주(예를 들어, B7-H4를 암호화하는 외인성 핵산이 결합될 수 있음)에 결합할 수 있다.
- [0162] 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 E Biosciences 14-5949 항-인간 B7H4 마우스 IgG와 비교할 때 더 높은 친화도로 OVCAR4 세포주에 결합한다.
- [0163] "E Biosciences 14-5949 항-인간 B7H4 마우스 IgG"에 대한 언급은 본원에서 용어 "B7-H4 단클론 항체(H74), eBioscience"와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 상기 항체는 ThermoFisher Scientific(카탈로그 번호 14-5949-82)에서 입수할 수 있다.
- [0164] 또 다른 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 US biological B0000-35B 항 인간 B7H4 마우스 IgG와 비교할 때 더 높은 친화도로 OVCAR4 세포주에 결합한다.
- [0165] 상기 친화도(예를 들어, 결합 친화도)는 본원에 기재된 결합 친화도를 측정하는 임의의 적합한 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0166] OVCAR4 세포주는 인간 난소 암종 세포주이다. OVCAR4 세포주는 암치료진단분과 중앙보관소(Division of Cancer Treatment and Diagnosis Tumor Repository)에서 세포주 이전을 위해 국립암연구소(National Cancer Institute)에서 입수할 수 있다. 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주는 중국 햄스터의 난소에서 유래한 상피 세포주로, 널리 입수 가능하다.
- [0167] 진술한 바와 같이, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 제약 조성물 내에 포함될 수 있다. 제약 조성물은 하나 이상의 제약상 허용 가능한 부형제(들)를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 본 발명의 제약 조성물은 제약상 허용 가능한 비독성 살균 담체, 예컨대 생리 식염수, 비독성 완충제, 보존제 등을 포함할 수 있다. 본원

에 개시된 치료 방법에 사용하기에 적합한 제형은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012)]에 기재되어 있다.

- [0168] 일 실시 형태에서, 본 발명의 제약 조성물은 캡슐, 정제, 수성 현탁액, 용액, 비강 에어로졸, 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 제형 내에 포함될 수 있다.
- [0169] 일 실시 형태에서, 제약 조성물은 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편의 1종 초과 유형을 포함한다. 예를 들어, 제약 조성물은 항체, 이의 항원 결합 단편, 세포독소에 접합된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 이들의 조합으로부터 선택된 둘 이상을 포함할 수 있다.
- [0170] 용어 항체 또는 항원 결합 단편의 "제약상 유효량"은 표적에 대한 유효한 결합을 달성하고 예를 들어, 질환 또는 병태의 증상을 완화시키거나 물질 또는 세포를 검출하는 것과 같은 이익을 달성하기에 충분한 양을 의미한다.
- [0171] 일 실시 형태에서, 제약 조성물은 완충제(예를 들어, 아세트이트, 포스페이트 또는 시트레이트 완충제), 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트), 선택적으로 안정화제(예를 들어, 인간 알부민) 등을 포함할 수 있다.
- [0172] 적합하게는, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 항체가 B7-H4를 표적화하는 데 치료제 또는 진단 시약으로서 유용하도록 충분한 친화도로 B7-H4 분자에 결합한다.
- [0173] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ pM}$, $\leq 1 \text{ pM}$, 또는 $\leq 0.1 \text{ pM}$ 의 해리 상수(KD)로 B7-H4(바람직하게는 인간 B7-H4)에 결합한다. 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 약 0.1 nM 내지 약 40 nM, 약 0.5 nM 내지 약 30 nM, 약 1 nM 내지 약 20 nM, 또는 약 1.5 nM 내지 약 20 nM의 KD로 B7-H4(바람직하게는 인간 B7-H4)에 결합한다.
- [0174] 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 약 23 nM 내지 약 27 nM의 KD로 B7-H4(바람직하게는 인간 B7-H4)에 결합한다. 더욱 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 약 1 nM 내지 약 1.5 nM의 KD로 B7-H4(바람직하게는 인간 B7-H4)에 결합한다.
- [0175] KD 측정(결합 친화도)은 당업계에 공지된 임의의 적합한 분석법에 의해 수행될 수 있다. 적합한 분석법은 KinExA 시스템(예를 들어, KinExA 3100, KinExA 3200 또는 KinExA 4000)(Sapidyne Instruments, Idaho) 또는 ForteBio Octet 시스템을 통해 수행할 수 있는 친화도 분석법을 포함한다.
- [0176] 일 실시 형태에서, 관련되지 않은 비 B7-H4 단백질에 대한 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합 정도는 B7-H4(바람직하게는 인간 B7-H4)에 대한 항체(또는 이의 항원 결합 단편)의 결합의 약 10%, 5%, 2% 또는 1% 미만(바람직하게는 약 10% 미만)이다. 상기 결합은, 예를 들어, 방사면역측정법(RIA), BIACORE®(분석물질로서 재조합 B7-H4 및 리간드로서 항체를 사용하거나 그 반대), KINEXA®, ForteBio Octet 시스템, 또는 당업계에 공지된 기타 결합 분석법에 의해 측정할 수 있다.
- [0177] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 B7-H1 분자, 인간 B7-H2 분자, 인간 B7-H3 분자, 인간 BTN1A1 분자, 인간 HHLA2 분자, 인간 BTN3A2 분자, 또는 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상에 결합하지 않는다. 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 B7-H1 분자, 인간 B7-H2 분자, 인간 B7-H3 분자 또는 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상에 결합하지 않는다.
- [0178] 용어 "결합하지 않는다"는 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 상기 분자(예를 들어, 인간 B7-H1 분자, 인간 B7-H2 분자, 인간 B7-H3 분자, 인간 BTN1A1 분자, 인간 HHLA2 분자, 인간 BTN3A2 분자, 또는 이들의 조합) 중 하나 이상에 실질적으로 결합하지 않는다는 것을 의미한다. 본원에서 결합의 맥락에서 사용될 때 용어 "실질적으로 없다"는 세포 배양물에서 상기 분자 중 하나 이상을 발현하는 세포의 5%, 2%, 1%, 0.5% 또는 0.1% 미만이 (접촉 시) 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 의해 결합된다는 것을 의미할 수 있다. 적합하게는, 본원에서 결합의 맥락에서 사용될 때 용어 "실질적으로 없다"는 이러한 세포가 결합되지 않음을 의미할 수 있다.
- [0179] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 B7-H1 분자, 인간 B7-H2 분자, 인간 B7-H3 분자, 인간 BTN1A1 분자, 인간 HHLA2 분자 또는 인간 BTN3A2 분자에 결합하지 않는다. 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 B7-H1 분자, 인간 B7-H2 분자 또는 인간 B7-H3 분자에 결합하지 않는다.
- [0180] 일 실시 형태에서, B7-H4 폴리펩티드는 B7-H4 폴리펩티드 서열 또는 이의 단편 내에 포함된다.
- [0181] "B7-H4 폴리펩티드"는 B7-H4의 전장 폴리펩티드 서열(예를 들어, 서열번호 55)을 포함할 수 있거나, 또는 본 발

명의 항체 또는 항원 결합 단편에 결합할 수 있는(예를 들어, 이에 의해 결합될 수 있는) 에피토프를 포함하는, B7-H4의 전장 폴리펩티드 서열의 임의의 길이(예를 들어, B7-H4의 전장 폴리펩티드 서열의 5%, 15%, 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 85% 또는 95%의 폴리펩티드 서열을 포함함)의 B7-H4의 단편을 포함할 수 있다. B7-H4 폴리펩티드는 서열번호 55의 서열과 75%, 80%, 85%, 90% 또는 90%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는, B7-H4 폴리펩티드는 서열번호 55의 서열을 포함한다.

[0182] 항체 또는 항원 결합 단편은 시험관 내 및 생체 내 둘 다에서 B7-H4에 대해 높은 친화도를 갖고, 따라서 B7-H4 에피토프를 검출하는 방법 및 관련 진단 방법에 유리하게 사용될 수 있다.

[0183] "치료"는 진단된 병리학적 상태 또는 장애를 치유하고/치유하거나, 늦추고/늦추거나, 이러한 상태 또는 장애의 증상을 경감시키고/경감시키거나, 이러한 상태 또는 장애의 진행을 중단시키는 치료적 조치를 지칭한다. 따라서, 치료를 필요로 하는 이는 이미 이러한 장애가 있는 이를 포함한다. 일 실시 형태에서, 대상체는 환자가 예컨대, 이러한 질환 또는 장애(바람직하게는 암)와 관련된 증상의 전체적, 부분적, 또는 일시적 경감 또는 제거를 보이는 경우, 본원에서 제공된 방법에 따라, 질환 또는 장애(바람직하게는 암)에 대해 성공적으로 "치료"된다.

[0184] 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 B7-H4를 발현하는 암 세포를 포함하는 암의 발병을 예방하기 위해 사용될 수 있다. "예방"은 표적화된 병리학적 상태 또는 장애의 발생을 예방하고/예방하거나 이를 늦추는 예방적 또는 방지적 조치를 지칭한다. 따라서, 예방을 필요로 하는 이는 이러한 장애를 앓기 쉽거나 이러한 장애에 취약한 이를 포함한다. 일 실시 형태에서, 환자가 일시적으로 또는 영구적으로 본 발명의 방법을 경험한 적이 없는 환자보다 예컨대, 질환 또는 장애와 관련하여 더 적거나 덜 심각한 증상, 또는 이러한 질환 또는 장애와 관련하여 더 늦은 증상의 발생을 발달시키는 경우, 본원에서 제공된 방법에 따라, 질환 또는 장애(바람직하게는 암)가 성공적으로 예방된다.

[0185] 용어 "대상체", "개체" 및 "환자"는 포유동물 대상체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 일 실시 형태에서 "대상체"는 인간, 가축, 농장 동물, 스포츠 동물 및 동물원 동물, 예를 들어 인간, 비인간 영장류, 개, 고양이, 기니피그, 토끼, 랫트, 마우스, 말, 소, 등이다. 일 실시 형태에서, 대상체는 시노몰구스 원숭이(마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*))이다. 바람직한 실시 형태에서, 대상체는 인간이다. 본 발명의 방법에서, 대상체는 암을 앓는 것으로 이전에 진단된 적이 없을 수 있다. 대안적으로, 대상체는 암을 앓는 것으로 이전에 진단된 적이 있을 수 있다. 대상체는 또한 질환 위험 인자를 나타내는 대상체 또는 암에 대해 무증상인 대상체일 수 있다. 대상체는 또한 암을 앓고 있거나 암이 발생할 위험이 있는 대상체일 수 있다. 따라서, 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 대상체에서 암의 존재를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 대상체는 이전에 대체 수단으로 암 진단을 받았을 수 있다. 일 실시 형태에서, 대상체는 암 치료법을 이전에 투여받은 적이 있다.

[0186] 일 실시 형태에서, 본 발명의 치료 방법은 경구, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피하, 직장, 또는 질내, 흡입, 국소 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 투여 단계를 포함한다. 바람직한 실시 형태에서, 투여는 정맥내 또는 동맥내(예를 들어, 주사 또는 드립에 의한), 또는 이들의 조합이다.

[0187] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 불리한 세포 집단의 부위에 직접 전달된다(예를 들어, 이에 의해 질병에 걸린 조직의 치료제에 대한 노출을 증가시킨다). 일 실시 형태에서, 이러한 투여는 예컨대, 흡입 또는 비강내 투여에 의해 직접적으로 기도로 한다.

[0188] 바람직한 실시 형태에서, 본원에 언급된 암은 B7-H4 분자의 발현(바람직하게는 과발현)을 특징으로 하는 암이다. 즉, 본원에서 언급되는 암은 B7-H4를 발현하는 양성 세포를 포함할 수 있다. 상기 양성 세포는 종양 내에 포함될 수 있다.

[0189] 일 실시 형태에서, 암은 유방암, 난소암, 자궁내막암, 담관암종, NSCLC(편평 및 선암종), 췌장암 및 위암으로부터 선택되는 하나 이상이다.

[0190] 일 실시 형태에서, 암은 결장직장암, HNSCC, 전립선암, 폐암(예를 들어 NSCLC 또는 SCLC), 유방암, 난소암 췌장암, 위암, 담관암종, 흑색종, 자궁내막암, 혈액암(AML, MM, DLBCL) 및 CSC를 포함하는 암으로부터 선택되는 하나 이상이다.

[0191] 바람직한 실시 형태에서, 암은 폐암, 유방암, 또는 이들의 조합이다. 예를 들어, 암은 폐암일 수 있다. 암은 유방암일 수 있다. 암은 난소암일 수 있다.

- [0192] 일 실시 형태에서, 암은 호르몬 수용체(HR)-양성(HR+) 유방암, 인간 표피 성장 인자 수용체 2 양성(HER2+) 유방암, 삼중 음성 유방암(TNBC)으로부터 선택되는 하나 이상의 유방암이다. 대상체는 허셉틴 적격일 수 있다. 대상체는 허셉틴 치료를 받았을 수 있다.
- [0193] 일 실시 형태에서, 암은 바람직하게는 편평 NSCLC, 선암종 NSCLC, 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 비소세포 폐암종(NSCLC)이다.
- [0194] 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 또한 예를 들어, 진단 방법의 일부로서 암 세포를 검출하는 데 유용성을 발견한다.
- [0195] 추가 양태에서, 샘플에서 B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)의 존재 또는 부재를 검출하는 방법이 제공되며, 방법은
- [0196] a. 샘플을 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제약 조성물과 접촉시켜 항체-항원 복합체를 제공하는 단계(여기서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함함:
- [0197] i. 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1(HCDR1), 중쇄 CDR2(HCDR2), 중쇄 CDR3(HCDR3), 경쇄 CDR1(LCDR1), 경쇄 CDR2(LCDR2) 및 경쇄 CDR3(LCDR3), 또는 이의 기능적 변이체;
- [0198] ii. 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0199] iii. 각각 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0200] iv. 각각 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체; 또는
- [0201] v. 각각 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체)
- [0202] b. 상기 항체-항원 복합체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하고,
- [0203] c. 여기서 항체-항원 복합체의 존재는 B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)의 존재를 확인시켜 주거나; 또는
- [0204] d. 여기서 항체-항원 복합체의 부재는 B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)의 부재를 확인시켜 준다.
- [0205] 관련 양태에서, 샘플에서 B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)를 발현하는 암 세포의 존재 또는 부재를 검출하는 방법이 제공되며, 방법은
- [0206] a. 샘플을 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제약 조성물과 접촉시켜 항체-항원 복합체를 제공하는 단계(여기서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함함:
- [0207] i. 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1(HCDR1), 중쇄 CDR2(HCDR2), 중쇄 CDR3(HCDR3), 경쇄 CDR1(LCDR1), 경쇄 CDR2(LCDR2) 및 경쇄 CDR3(LCDR3), 또는 이의 기능적 변이체;
- [0208] ii. 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0209] iii. 각각 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;
- [0210] iv. 각각 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체; 또는
- [0211] v. 각각 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체);

- [0212] b. 상기 항체-항원 복합체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하고,
- [0213] c. 여기서 항체-항원 복합체의 존재는 B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)의 존재를 확인시켜 주거나; 또는
- [0214] d. 여기서 항체-항원 복합체의 부재는 B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)의 부재를 확인시켜 준다.
- [0215] 본 발명은 B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)를 검출하기 위한 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 상응하는 용도를 포함한다.
- [0216] 일 실시 형태에서, 항체-항원 복합체의 존재는 암 세포의 존재를 나타내고, 항체-항원 복합체의 부재는 암 세포의 부재를 나타낸다. 예를 들어, 방법은 항체-항원 복합체가 검출되는 경우 암의 존재를 확인하거나, 항체-항원 복합체가 검출되지 않는 경우 암의 존재를 확인하지 않는 것을 포함할 수 있다.
- [0217] 바람직한 실시 형태에서, 암 세포는 B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)를 발현하는 암 세포이다.
- [0218] 따라서, 본 발명은 바람직하게는 상기 암이 B7-H4 발현 암 세포를 포함하는, 암에 걸린 대상체를 진단하는 방법에서 본원에 기재된 방법 단계의 상응하는 용도를 포함한다.
- [0219] 일 실시 형태에서, 검출 방법 또는 진단 방법은 대상체로부터 수득 가능한 세포(또는 조직) 상의 B7-H4의 발현 수준을 측정하는 단계 및 측정된 발현 수준을 대조군 세포(또는 조직)에서의 표준 B7-H4 발현과 비교하는 단계를 포함할 수 있고, 여기서 대조군과 비교하여 발현 수준의 증가는 암의 존재를 나타낸다. 바람직하게는, 상기 대조군 샘플은 비암(예를 들어, 정상) 세포를 포함한다.
- [0220] "항체-항원 복합체"는 항체에 결합하게 된 B7-H4 항원을 포함하는 복합체(예를 들어, 거대분자 복합체)를 의미한다. 용어 "항체-항원 복합체"는 용어 "결합된 B7-H4-항체 복합체" 및 "B7-H4에 결합된 항체"와 동의어로 사용될 수 있다.
- [0221] 항체-항원 복합체는 당업자에게 공지된 임의의 수단에 의해 검출될 수 있다. 일 실시 형태에서, 항체(또는 이의 항원 결합 단편)은 검출 가능한 표지가 부착된다. 상기 표지는 에피-형광 표지일 수 있다. 바람직한 실시 형태에서, 항체는 800CW로 표지된다.
- [0222] 일 실시 형태에서, 항체-항원 복합체는 항체 및/또는 항체-항원 복합체에 결합하는 2차(예를 들어, 검출) 항체에 의해 검출된다.
- [0223] 적합하게는, 상기 2차 항체는 검출을 돕기 위한 태그/표지와 같은 검출 수단을 포함한다. 상기 검출 수단은 바람직하게는 2차 항체에 접합된다. 적합한 표지의 예에는 방사성 표지 또는 형광 또는 유색 분자, 효소 마커 또는 발색 마커 - 예를 들어, 검출 항체가 항원에 결합할 때 가시적인 색상 변화를 제공하는 염료와 같은 검출 가능한 표지를 포함한다. 예를 들어, 표지는 플루오레세인-이소티오시아네이트(FITC), R-피코에리트린, Alexa 532, CY3 또는 디곡시게닌일 수 있다. 표지는 형광 신호를 검출하거나 표지를 사진 필름 또는 X선 필름에 노출시키는 것과 같이 직접 검출되는 리포터 분자일 수 있다. 대안적으로, 표지는 직접 검출될 수 없지만 예를 들어 2상 시스템에서 검출될 수 있다. 간접 표지 검출의 예는 표지에 대한 항체의 결합이다.
- [0224] 바람직한 실시 형태에서, 상기 2차 항체는 형광 태그를 포함하고, 항체-항원 복합체는 항체-항원-2차 항체 복합체로부터 방출되는 형광에 의해 검출된다. "항체-항원-2차 항체 복합체"는 항체에 결합된 항원(예를 들어, B7-H4)을 포함하는 복합체를 의미하며, 상기 복합체는 상기 항체 및/또는 항체-항원 복합체에 결합하는 2차 항체에 의해 추가로 결합된 것이다.
- [0225] 적합하게는, 항체-항원 복합체는 검출 표지로부터 방출된 신호(바람직하게는 형광)가 항체를 포함하지 않는 대조군(예를 들어, B7-H4에 결합하는 항체가 없음)에서 검출된 신호보다 클 때 검출된다. 상기 대조군은 대안적으로 B7-H4를 포함할 수 있지만, 샘플은 상기 대조군에 적용되지 않는다.
- [0226] 적합하게는, "샘플"은 대상체(예를 들어, 생검), 세포주, 조직 배양물, 또는 잠재적으로 B7-H4를 발현하는 기타 세포 공급원으로부터 얻은 샘플이다. 바람직한 실시 형태에서, 샘플은 대상체로부터의 생검이다. 상기 생검은 종양으로부터 또는 종양이 발병할 위험이 있는 부위로부터 채취될 수 있다.
- [0227] 바람직한 실시 형태에서, 샘플은 대상체로부터 수득할 수 있는(예를 들어, 수득한) 분리된 샘플이다.

- [0228] 바람직한 실시 형태에서, B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)는 암 세포의 필수 구성요소, 더욱 바람직하게는 암 세포 세포막의 필수 구성요소이다.
- [0229] 본 발명은 인용된 CDR 서열 또는 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열(기준 항체)을 갖는 본원에 정의된 항체(예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편) 및 이의 기능적 변이체를 포함한다. 기능적 변이체는 기준 항체와 동일한 표적 항원에 결합하고 바람직하게는 기준 항체와 동일한 항원 교차 반응성을 나타낸다. 기능적 변이체는 기준 항체와 비교할 때 표적 항원에 대해 다른 친화도를 가질 수 있으나, 실질적으로 동일한 친화도가 바람직하다.
- [0230] 용어 "기준 항체"는 본 발명의 항체 또는 이의 항원을 비교할 때 편리하게 지칭하는 데 사용된다. 따라서, 용어 "기준 항체"는 본 발명의 항체 또는 이의 항원을 지칭한다. 예를 들어, 기준 항체는 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 의미할 수 있다. 더욱 특별하게는, 기준 항체는 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄; 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 의미할 수 있다. 바람직하게는, 기준 항체는 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄; 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 의미할 수 있다.
- [0231] 일 실시 형태에서, 기준 항체의 기능적 변이체들은 상응하는 기준 CDR 서열들과 비교할 때 하나 이상의 CDR에서 서열 변이를 나타낸다. 따라서, 기능적 항체 변이체는 CDR의 기능적 변이체를 포함할 수 있다. 용어 "기능적 변이체"가 CDR 서열의 맥락에서 사용되는 경우, 이는 CDR이 상응하는 기준 CDR 서열과 비교될 때 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산 차이를 가지며, 나머지 5개의 CDR(또는 이의 변이체)과 조합되는 경우 변이형 항체가 기준 항체와 동일한 표적 항원에 결합할 수 있도록 하고, 바람직하게는 기준 항체와 동일한 항원 반응성을 나타낼 수 있도록 한다는 것을 의미한다. 기능적 변이체는 "변이형 항체"로 지칭될 수 있다.
- [0232] 일 실시 형태에서 변이형 항체(또는 이의 항원 결합 단편)은
- [0233] 상응하는 기준 CDR 서열과 비교할 때 최대 2개의 아미노산 차이를 갖는 경쇄 CDR1;
- [0234] 상응하는 기준 CDR 서열과 비교할 때 최대 2개의 아미노산 차이를 갖는 경쇄 CDR2;
- [0235] 상응하는 기준 CDR 서열과 비교할 때 최대 2개의 아미노산 차이를 갖는 경쇄 CDR3;
- [0236] 상응하는 기준 CDR 서열과 비교할 때 최대 2개의 아미노산 차이를 갖는 중쇄 CDR1;
- [0237] 상응하는 기준 CDR 서열과 비교할 때 최대 2개의 아미노산 차이를 갖는 중쇄 CDR2; 및
- [0238] 상응하는 기준 CDR 서열과 비교할 때 최대 2개의 아미노산 차이를 갖는 중쇄 CDR3을 포함하고,
- [0239] 변이형 항체는 기준 항체와 동일한 표적 항원에 결합하고 바람직하게는 기준 항체와 동일한 항원 교차 반응성(또는 이의 결여)을 나타낸다.
- [0240] 바람직하게는 변이형 항체(또는 이의 항원 결합 단편)은
- [0241] 상응하는 기준 CDR 서열과 비교할 때 최대 1개의 아미노산 차이를 갖는 경쇄 CDR1;
- [0242] 상응하는 기준 CDR 서열과 비교할 때 최대 1개의 아미노산 차이를 갖는 경쇄 CDR2;
- [0243] 상응하는 기준 CDR 서열과 비교할 때 최대 1개의 아미노산 차이를 갖는 경쇄 CDR3;
- [0244] 상응하는 기준 CDR 서열과 비교할 때 최대 1개의 아미노산 차이를 갖는 중쇄 CDR1;
- [0245] 상응하는 기준 CDR 서열과 비교할 때 최대 1개의 아미노산 차이를 갖는 중쇄 CDR2; 및
- [0246] 상응하는 기준 CDR 서열과 비교할 때 최대 1개의 아미노산 차이를 갖는 중쇄 CDR3을 포함하고,
- [0247] 변이형 항체는 기준 항체와 동일한 표적 항원에 결합하고 바람직하게는 기준 항체와 동일한 항원 교차 반응성(또는 이의 결여)을 나타낸다.
- [0248] 예를 들어, 항체의 변이체 또는 항원 결합 단편은
- [0249] 서열번호 7과 비교할 때 최대 2개의 아미노산 차이를 갖는 중쇄 CDR1;
- [0250] 서열번호 8과 비교할 때 최대 2개의 아미노산 차이를 갖는 중쇄 CDR2; 및

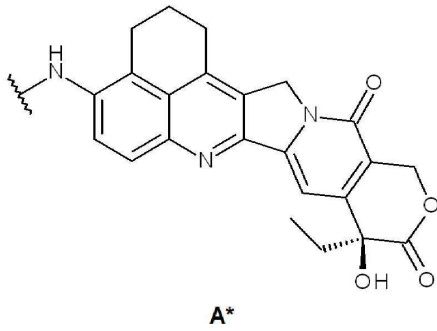
- [0251] 서열번호 9와 비교할 때 최대 2개의 아미노산 차이를 갖는 중쇄 CDR3;
- [0252] 서열번호 10과 비교할 때 최대 2개의 아미노산 차이를 갖는 경쇄 CDR1;
- [0253] 서열번호 11과 비교할 때 최대 2개의 아미노산 차이를 갖는 경쇄 CDR2;
- [0254] 서열번호 12와 비교할 때 최대 2개의 아미노산 차이를 갖는 경쇄 CDR3을 포함할 수 있고,
- [0255] 변이형 항체는 B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)에 결합하고 바람직하게는 기준 항체 또는 항원 결합 단편과 동일한 항원 교차 반응성(또는 이의 결여)을 나타낸다.
- [0256] 예를 들어, 항체의 변이체 또는 항원 결합 단편은 (바람직하게는)
- [0257] 서열번호 7과 비교할 때 최대 1개의 아미노산 차이를 갖는 중쇄 CDR1;
- [0258] 서열번호 8과 비교할 때 최대 1개의 아미노산 차이를 갖는 중쇄 CDR2; 및
- [0259] 서열번호 9와 비교할 때 최대 1개의 아미노산 차이를 갖는 중쇄 CDR3;
- [0260] 서열번호 10과 비교할 때 최대 1개의 아미노산 차이를 갖는 경쇄 CDR1;
- [0261] 서열번호 11과 비교할 때 최대 1개의 아미노산 차이를 갖는 경쇄 CDR2;
- [0262] 서열번호 12와 비교할 때 최대 1개의 아미노산 차이를 갖는 경쇄 CDR3을 포함할 수 있고,
- [0263] 변이형 항체는 B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)에 결합하고 바람직하게는 기준 항체 또는 항원 결합 단편과 동일한 항원 교차 반응성(또는 이의 결여)을 나타낸다.
- [0264] 전술한 내용은 본원에 기재된 다른 항체의 변이체에 유사하게 적용될 수 있으며, 여기서, 아미노산 차이는 이의 CDR 서열에 대해 정의되고, 변이형 항체는 상기 항체와 동일한 표적 항원에 결합하고, 바람직하게는 동일한 항원 교차 반응성을 나타낸다.
- [0265] 일 실시 형태에서, 변이형 항체는 상응하는 기준 항체와 비교할 때 이의 CDR에서 총 최대 5, 4 또는 3개의 아미노산 차이를 가질 수 있으며, 단, CDR당 최대 2개(바람직하게는, 최대 1개)의 아미노산 차이가 존재한다. 바람직하게는 변이형 항체는 상응하는 기준 항체와 비교할 때 이의 CDR에서 총 최대 2개(더욱 바람직하게는 최대 1개)의 아미노산 차이를 가지며, 단, CDR당 최대 2개의 아미노산 차이가 존재한다. 더욱 바람직하게는, 변이형 항체는 상응하는 기준 항체와 비교할 때 이의 CDR에서 총 최대 2개(더욱 바람직하게는 최대 1개)의 아미노산 차이를 가지며, 단, CDR당 최대 1개의 아미노산 차이가 존재한다.
- [0266] 아미노산 차이는 아미노산 치환, 삽입 또는 결실일 수 있다. 일 실시 형태에서, 아미노산 차이는 본원에 기재된 바와 같은 보존적 아미노산 치환이다.
- [0267] 일 실시 형태에서, 변이형 항체는 본원에 기재된 예시적인 항체와 동일한 프레임워크 서열을 갖는다. 또 다른 실시 형태에서, 변이형 항체는 (상응하는 기준 프레임워크 서열과 비교할 때) 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산 차이를 갖는 프레임워크 영역을 포함할 수 있다. 따라서, 각각의 프레임워크 영역은 (상응하는 기준 프레임워크 서열과 비교할 때) 최대 2개, 바람직하게는 최대 1개의 아미노산 차이를 가질 수 있다.
- [0268] 일 실시 형태에서, 변이형 항체는 상응하는 기준 항체와 비교할 때 이의 프레임워크 영역에서 총 최대 5, 4 또는 3개의 아미노산 차이를 가질 수 있으며, 단, 프레임워크 영역당 최대 2개(바람직하게는 최대 1개)의 아미노산 차이가 존재한다. 바람직하게는 변이형 항체는 상응하는 기준 항체와 비교할 때 이의 프레임워크 영역에서 총 최대 2개(더욱 바람직하게는 최대 1개)의 아미노산 차이를 가지며, 단, 프레임워크 영역당 최대 2개의 아미노산 차이가 존재한다. 더욱 바람직하게는, 변이형 항체는 상응하는 기준 항체와 비교할 때 이의 프레임워크 영역에서 총 최대 2개(더욱 바람직하게는 최대 1개)의 아미노산 차이를 가지며, 단, 프레임워크 영역당 최대 1개의 아미노산 차이가 존재한다.
- [0269] 따라서, 변이형 항체는 본원에 기재된 바와 같은 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 포함할 수 있으며,
- [0270] 중쇄는 본원에서의 중쇄 서열과 비교할 때 최대 14개의 아미노산 차이(각각의 CDR에서 최대 2개의 아미노산 차이 및 각각의 프레임워크 영역에서 최대 2개의 아미노산 차이)를 가지며;
- [0271] 경쇄는 본원에서의 경쇄 서열과 비교할 때 최대 14개의 아미노산 차이(각각의 CDR에서 최대 2개의 아미노산 차이 및 각각의 프레임워크 영역에서 최대 2개의 아미노산 차이)를 가지며;

- [0272] 변이형 항체는 기준 항체와 동일한 표적 항원에 결합하고 바람직하게는 기준 항체와 동일한 항원 교차 반응성 (또는 이의 결여)을 나타낸다.
- [0273] 상기 변이체 중쇄 또는 경쇄는 기준 중쇄 또는 경쇄의 "기능적 등가물"로 지칭될 수 있다.
- [0274] 일 실시 형태에서, 변이형 항체는 본원에 기재된 바와 같은 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 포함할 수 있으며,
- [0275] 중쇄는 본원에서의 중쇄 서열과 비교할 때 최대 7개의 아미노산 차이(각각의 CDR에서 최대 1개의 아미노산 차이 및 각각의 프레임워크 영역에서 최대 1개의 아미노산 차이)를 가지며;
- [0276] 경쇄는 본원에서의 경쇄 서열과 비교할 때 최대 7개의 아미노산 차이(각각의 CDR에서 최대 1개의 아미노산 차이 및 각각의 프레임워크 영역에서 최대 1개의 아미노산 차이)를 가지며;
- [0277] 변이형 항체는 기준 항체와 동일한 표적 항원에 결합하고 바람직하게는 기준 항체와 동일한 항원 교차 반응성 (또는 이의 결여)을 나타낸다.
- [0278] 항체-약물 접합체(ADC)
- [0279] 유리하게는, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 이중 작용제를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 이중 작용제에 연결된다. 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 이중 작용제에 접합된다. 적합하게는, "접합된"은 공유 결합 또는 이온 결합을 통해 연결된 것을 의미한다. 바람직하게는, 상기 이중 작용제는 세포독소이다.
- [0280] 이중 작용제는 간단히 "작용제" 또는 "활성제"로 지칭될 수 있다. 예를 들어, 대체 언어로, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 활성제를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 활성제에 연결된다. 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 활성제에 접합된다.
- [0281] 이중/활성 작용제는 약물일 수 있다. 바람직하게는, 이중/활성 작용제는 세포독소이다.
- [0282] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 하기 기재된 바와 같이 치료 방법에서 이중/활성 작용제에 연결(예를 들어, 접합)되는 것이 특히 바람직하다.
- [0283] 본 발명의 작용제 및/또는 세포독소는 스페이서(예를 들어, 하나 이상의 스페이서)에 의해 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 접합될 수 있다. 일 실시 형태에서, 스페이서는 펩티드 스페이서이다. 일 실시 형태에서, 스페이서는 비 펩티드(예를 들어, 화학적) 스페이서이다.
- [0284] 세포독성제 또는 세포독소는 세포의 기능을 억제하거나 방해하고/하거나, 세포의 파괴(세포 사멸)을 야기하고/하거나, 항-신생물/항-증식 효과를 발휘하는 당업계에서 공지된 임의의 분자일 수 있다. 여러 부류의 세포독성제들이 ADC 분자에서 잠재적인 유용성을 갖고 있다고 알려져 있다. 이들은 토포이소머라제 I 억제제, 아미나타인, 아우리스타틴, 다우노마이신, 독소루비신, 듀오카르마이신, 돌라스타틴, 에네디인, 렉시트롭신, 탁산, 푸로마이신, 메이탄시노이드, 빈카 알칼로이드, 튜블라이신 및 피롤로벤조디아제핀(PBD)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 세포독성제의 예는 AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEBV, 아우리스타틴 E, 파클리탁셀, 도세탁셀, CC-1065, SN-38, 토포테칸, 모르폴리노-독소루비신, 리족신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 돌라스타틴-10, 에키노마이신, 콤프레타스타틴, 칼리케아미신, 메이탄신, DM-1, 빈블라스틴, 메토틱렉세이트 및 네트롭신, 및 이의 유도체 및 유사체이다. ADC에 사용하기에 적합한 세포독소와 관련된 추가적인 개시는 예를 들어, 전체가 본원에 참조로 포함된, 국제 특허출원 공개번호 WO 2015/155345 및 WO 2015/157592에서 찾아볼 수 있다.
- [0285] 예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편은 "항체-약물 접합체"(ADC)를 제공하기 위해 이러한 이중 작용제에 접합될 수 있다.
- [0286] 작용제는 전형적으로 항체 또는 항원 결합 단편에 연결되거나 "로딩"된다. 작용제 로딩 (p)는 항체 또는 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)당 작용제(들)의 평균 수이다.
- [0287] 접합 반응으로부터의 ADC 제제에서 항체(또는 항원 결합 단편)당 작용제의 평균 개수는 UV, 역상 HPLC, HIC, 질량 분광분석법, ELISA 분석 및 전기영동과 같은 통상의 수단에 의해 특성화될 수 있다. 또한 p의 측면에서 ADC의 정량적 분포가 결정될 수 있다. ELISA에 의해 ADC의 특정 제제에서 p의 평균값을 결정할 수 있다(문헌 [Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852]). 일부 예에서, p가 다른 약물 로딩을 갖는 ADC로부터의 특정한 값인 경우, 균질한 ADC의 분리, 정제 및 특성화는 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단에 의해 달성될 수 있다. 이러한 기술은 또한 다른 유형의

접합체에도 적용될 수 있다.

- [0288] 시스테인 아미노산은 항체(또는 이의 항원 결합 단편) 내의 반응성 부위에서 조작될 수 있고, 이것은 바람직하게는 쇠간 또는 분자간 이황화 결합을 형성하지 않는다(문헌[Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721-2729]; 미국 특허 제7521541호; 미국 특허 제7723485호; WO2009/052249호). 조작된 시스테인 티올은 말레이미드 또는 알파-할로 아미드와 같은 티올-반응성 친전자성기를 가질 수 있는 작용제(예를 들어, 아래 화학식 I의 작용제) 내의 링커와 반응하여 시스테인 조작된 항체를 갖는 ADC를 형성할 수 있다. 따라서, 약물 단위의 위치가 설계, 제어 및 공지될 수 있다. 조작된 시스테인 티올기는 일반적으로 약물-링커 시약과 높은 수율로 반응하기 때문에 약물 로딩이 제어될 수 있다. IgG 항체의 조작으로 중쇄 또는 경쇄 상의 단일 부위에서의 치환에 의해 시스테인 아미노산을 도입하는 것은 대칭 항체 상에 2개의 새로운 시스테인을 제공한다. 2에 가까운 약물 로딩이 달성되고, 접합 산물 ADC의 균질성에 접근할 수 있다.
- [0289] 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 복수개의 친핵성 또는 친전자성기가 작용제와 반응하는 경우, 생성된 생성물은 예를 들어, 1, 2, 3개 등의 항체에 부착된 작용제 단위의 분포를 갖는 ADC 화합물의 혼합물일 수 있다. 폴리머 역상(PLRP) 및 소수성 상호작용(HIC)과 같은 액체 크로마토그래피 방법은 작용제 로딩값에 의해 혼합물에서 화합물을 분리할 수 있다. 단일 작용제 로딩값 (p)을 갖는 ADC의 체제가 분리될 수 있다.
- [0290] 따라서, 본 발명의 항체-약물 접합체 조성물은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 하나 이상의 작용제 모이어티를 갖고 작용제 모이어티가 다양한 아미노산 잔기에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 부착될 수 있는 경우에 항체-약물 접합체의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0291] 일 실시 형태에서, 항체(또는 이의 항원 결합 단편)당 작용제의 평균 수는 1 내지 20의 범위이다. 일부 실시 형태에서 범위는 1 내지 10, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6 및 4 내지 10으로부터 선택된다. 일부 실시 형태에서, 항체(또는 이의 항원 결합 단편)당 하나의 작용제가 있다. 일부 실시 형태에서, 항체(또는 이의 항원 결합 단편)당 작용제의 수는 작용제(즉, 약물) 대 항체의 비율로 표현될 수 있다. 이 비율은 약물 대 항체 비율(DAR)로 지칭된다. DAR은 각 항체에 연결된 약물(즉, 작용제)의 평균 수이다. 본 발명의 일 실시 형태에서, DAR은 1 내지 20의 범위이다. 일부 실시 형태에서, DAR의 범위는 1 내지 10, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6 및 4 내지 10으로부터 선택된다. 본 발명의 특정 실시 형태에서, DAR은 약 8이다. 본 발명의 특정 실시 형태에서, DAR은 8이다.
- [0292] 일 실시 형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 토포이소머라제 I 억제제, 튜블라이신 유도체, 피롤로벤조디아제핀, 항미생물제, 치료제, 전구약물, 펩티드, 단백질, 효소, 지질, 생물학적 반응 개질제, 약제, 램포카인, 이중 항체, 이중 항체의 단편, 검출 가능한 표지, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 방사성 동위원소 또는 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 이중 작용제에 접합된다.
- [0293] 일 실시 형태에서, 항체 항원 결합 단편은 토포이소머라제 I 억제제, 튜블라이신 유도체, 피롤로벤조디아제핀 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 세포독소에 접합된다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 토포이소머라제 I 억제제 SG3932, SG4010, SG4057 또는 SG4052(이의 구조는 아래에 제공됨); 튜블라이신 AZ1508, 피롤로벤조디아제핀 SG3315, 피롤로벤조디아제핀 SG3249, 또는 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포독소에 접합된다.
- [0294] 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 토포이소머라제 I 억제제에 접합될 수 있는 것이 바람직하다. 토포이소머라제 억제제는 정상 세포 주기 동안 DNA 가닥의 포스포디에스테르 백본의 과단 및 재결합에 촉매작용을 함으로써 DNA 구조의 변화를 제어하는 효소인 토포이소머라제(토포이소머라제 I 및 II)의 작용을 차단하는 화학적 화합물이다.

[0295] 적합한 토포이소머라제 I 억제제의 일반적인 예는 다음 화합물로 표시된다:

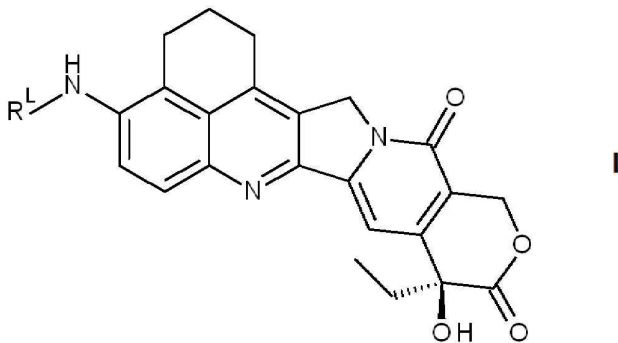


[0296] 상기 화합물은 A*로 표시되며, 본원에서 "약물 단위"로 지칭될 수 있다.

[0297]

[0298] 화합물(예를 들어 A*)은 바람직하게는 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편("리간드 단위"로 지칭될 수 있음)에 연결(바람직하게는 접합)하기 위한 링커와 함께 제공된다. 적합하게는, 링커는 절단 가능한 방식으로 아미노 잔기, 예를 들어 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편의 아미노산에 부착(예를 들어 접합)된다.

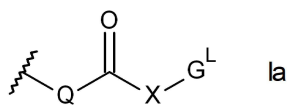
[0299] 더욱 특별하게는, 적합한 토포이소머라제 I 억제제의 예는 화학식 "I"의 하기 화합물:



[0300]

[0301] 및 이의 염 및 용매화물로 표시되고, 여기서 R^L 은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)에 연결하기 위한 링커이고, 여기서 상기 링커는 바람직하게는 다음으로부터 선택된다:

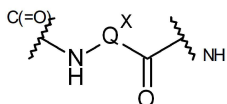
[0302] (ia):



[0303]

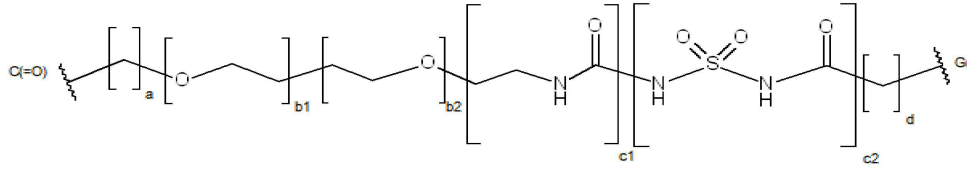
[0304] (상기 식에서,

[0305] Q는



[0306] 이고, Q^X 는 Q가 아미노산 잔기, 디펩티드 잔기, 트리펩티드 잔기 또는 테트라펩티드 잔기가 되도록 하는 것이고;

[0307] X는

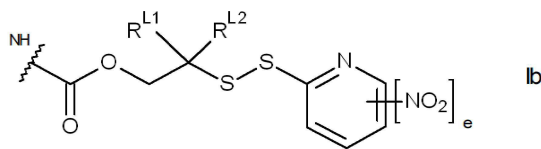


[0308]

[0309] 상기 식에서, $a = 0$ 내지 5 이고, $b1 = 0$ 내지 16 이고, $b2 = 0$ 내지 16 이고, $c1 = 0$ 또는 1 이고, $c2 = 0$ 또는 1 이고, $d = 0$ 내지 5 이고, 적어도 $b1$ 또는 $b2 = 0$ (즉, $b1$ 과 $b2$ 중 하나만 0 이 아닐 수 있음)이고, 적어도 $c1$ 또는 $c2 = 0$ (즉, $c1$ 과 $c2$ 중 하나만 0 이 아닐 수 있음)이고;

[0310] G^L 은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)에 연결하기 위한 링커임); 또는

[0311] (ib):



[0312]

[0313] (상기 식에서, R^{L1} 및 R^{L2} 는 독립적으로 H 및 메틸로부터 선택되거나, 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 시클로프로필렌 또는 시클로부틸렌기를 형성하고;

[0314] e 는 0 또는 1 임).

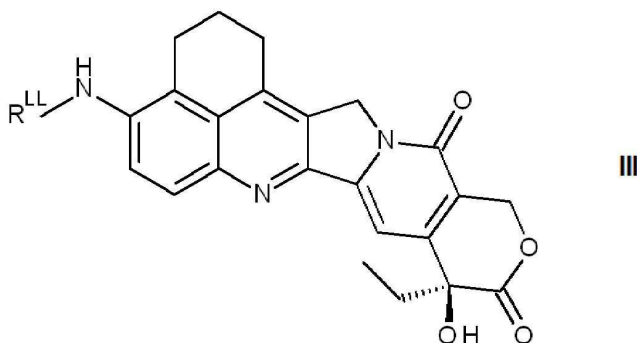
[0315] 1 종 초과와 상기 작용제(들)(예를 들어, 토포이소머라제 I 억제제)가 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 접합될 수 있음을 당업자는 이해할 것이다.

[0316] 예를 들어, 본 발명의 접합체(예를 들어, 항체-약물 접합체)는 일반식 IV의 접합체:

[0317] [화학식 IV]

[0318] $L - (D^L)_p$

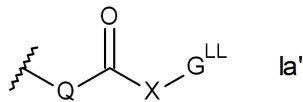
[0319] 또는 이의 제약상 허용 가능한 염 또는 용매화물일 수 있고, 여기서 L 은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)이고, D^L 은 화학식 III의 링커(예를 들어, 약물 링커 단위)를 갖는 토포이소머라제 I 억제제이다:



[0320]

[0321] R^{LL} 은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)에 연결된 링커이고, 여기서 링커는 바람직하게는 다음으로부터 선택된다:

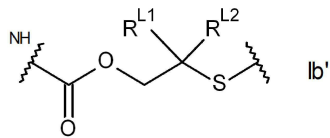
[0322] (ia'):



[0323]

[0324] (Q 및 X는 상기에 정의된 바와 같고, G^{LL}은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)에 연결된 링커임); 및

[0325] (ib'):



[0326]

[0327] (R^{L1} 및 R^{L2}는 상기에 정의된 바와 같고;

[0328] p는 1 내지 20의 정수임).

[0329] 약물 로딩은 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)당 토포이소머라제 I 억제제(들)(예를 들어, 약물 단위)의 수인 p로 표시된다. 약물 로딩의 범위는 리간드 단위당 1 내지 20의 약물 단위(D)일 수 있다. 조성물의 경우, p는 조성물에서 접합체의 평균 약물 로딩을 나타내고, p의 범위는 1 내지 20이다.

[0330] 따라서, 본 발명자는 적어도 하나의 토포이소머라제 I 억제제(예를 들어, 상기 예시된 A*와 같은 약물 단위)에 공유 연결된 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)을 포함하는 접합체를 포함한다. 상기 억제제는 바람직하게는 R^L 및/또는 R^{LL}로서 상기 기재된 링커와 같은 링커(예를 들어, 링커 단위)에 의해 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 연결된다. 즉, 본 발명은 바람직하게는 링커(예를 들어, 약물-링커 단위)를 통해 부착된 하나 이상의 토포이소머라제 I 억제제를 갖는 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)을 포함한다. 상기에서 보다 충분히 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(리간드 단위를 나타냄)은 표적 모이어티에 결합하는 표적화제이다. 더욱 특별하게는, 이 리간드 단위는 예를 들어 약물 단위가 전달되는 표적 세포 상의 B7-H4에 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 예를 들어 다양한 암 및 기타 장애를 ADC로 치료하는 방법을 제공한다(예를 들어, B7-H4를 발현하는 세포, 바람직하게는 암성 세포의 존재와 관련된 암/장애).

[0331] 추가 바람직한 예

[0332] 상기 기재된 토포이소머라제 I 억제제의 특정 특징이 특히 바람직하며 하기에 제시된 바와 같이 보다 상세하게 정의될 수 있다. 예를 들어, (예를 들어, 전술한 1a의 링커 내의) 특징 Q^x의 바람직한 실시 형태가 개략적으로 설명될 것이다.

[0333] 하기 바람직한 예는 전술한 바와 같이 본 발명의 모든 양태에 적용될 수 있거나 단일 양태와 관련될 수 있다. 바람직한 예는 임의의 조합으로 함께 결합될 수 있다.

[0334] 이 섹션의 특정 용어와 관련된 다양한 정의는 아래 제공된 "정의"라는 표제 아래에 제공된다.

[0335] Q^x

[0336] 일 실시 형태에서, Q는 아미노산 잔기이다. 아미노산은 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산일 수 있다. 예를 들어, Q는 Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg 및 Trp로부터 선택될 수 있고, Cit는 시트룰린이다.

[0337] 일 실시 형태에서, Q는 디펩티드 잔기를 포함한다. 디펩티드의 아미노산은 천연 아미노산과 비천연 아미노산의 임의의 조합일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 디펩티드는 천연 아미노산을 포함한다. 링커가 카텝신 불안정성 링커인 경우, 디펩티드는 카텝신 매개 절단에 대한 작용 부위이다. 즉 디펩티드는 카텝신에 대한 인식 부위이다.

- [0338] 일 실시 형태에서, Q는
- [0339] $\text{NH}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{C}(=\text{O})$,
 [0340] $\text{NH}-\text{Val}-\text{Ala}-\text{C}(=\text{O})$,
 [0341] $\text{NH}-\text{Val}-\text{Lys}-\text{C}(=\text{O})$,
 [0342] $\text{NH}-\text{Ala}-\text{Lys}-\text{C}(=\text{O})$,
 [0343] $\text{NH}-\text{Val}-\text{Cit}-\text{C}(=\text{O})$,
 [0344] $\text{NH}-\text{Phe}-\text{Cit}-\text{C}(=\text{O})$,
 [0345] $\text{NH}-\text{Leu}-\text{Cit}-\text{C}(=\text{O})$,
 [0346] $\text{NH}-\text{Ile}-\text{Cit}-\text{C}(=\text{O})$,
 [0347] $\text{NH}-\text{Phe}-\text{Arg}-\text{C}(=\text{O})$,
 [0348] $\text{NH}-\text{Trp}-\text{Cit}-\text{C}(=\text{O})$, 및
 [0349] $\text{NH}-\text{Gly}-\text{Val}-\text{C}(=\text{O})$ 로부터 선택되며,
 [0350] 여기서, Cit는 시트룰린이다.
- [0351] 바람직하게는, Q는
- [0352] $\text{NH}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{C}(=\text{O})$,
 [0353] $\text{NH}-\text{Val}-\text{Ala}-\text{C}(=\text{O})$,
 [0354] $\text{NH}-\text{Val}-\text{Lys}-\text{C}(=\text{O})$,
 [0355] $\text{NH}-\text{Ala}-\text{Lys}-\text{C}(=\text{O})$, 및
 [0356] $\text{NH}-\text{Val}-\text{Cit}-\text{C}(=\text{O})$ 로부터 선택된다.
- [0357] 더욱 바람직하게는, Q는 $\text{NH}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{C}(=\text{O})$, $\text{NH}-\text{Val}-\text{Cit}-\text{C}(=\text{O})$ 또는 $\text{NH}-\text{Val}-\text{Ala}-\text{C}(=\text{O})$ 로부터 선택된다.
- [0358] 기타 적합한 디펩티드 조합물은
- [0359] $\text{NH}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{C}(=\text{O})$,
 [0360] $\text{NH}-\text{Gly}-\text{Val}-\text{C}(=\text{O})$,
 [0361] $\text{NH}-\text{Pro}-\text{Pro}-\text{C}(=\text{O})$, 및
 [0362] $\text{NH}-\text{Val}-\text{Glu}-\text{C}(=\text{O})$ 를 포함한다.
- [0363] 본원에 참조로 포함되는 문헌[Dubowchik et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869]에 기재된 것을 포함하여 다른 디펩티드 조합물이 사용될 수 있다.
- [0364] 일부 실시 형태에서, Q는 트리펩티드 잔기이다. 트리펩티드의 아미노산은 천연 아미노산과 비천연 아미노산의 임의의 조합일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 트리펩티드는 천연 아미노산을 포함한다. 링커가 카텝신 불안정성 링커인 경우, 트리펩티드는 카텝신 매개 절단에 대한 작용 부위이다. 즉 트리펩티드는 카텝신에 대한 인식 부위이다. 특히 관심 대상인 트리펩티드 링커는 다음과 같다:

[0365] $\text{NH}-\text{Glu}-\text{Val}-\text{Ala}-\text{C}(=\text{O})$

[0366] $\text{NH}-\text{Glu}-\text{Val}-\text{Cit}-\text{C}(=\text{O})$

[0367] $\text{NH}-\alpha\text{Glu}-\text{Val}-\text{Ala}-\text{C}(=\text{O})$

[0368] $\text{NH}-\alpha\text{Glu}-\text{Val}-\text{Cit}-\text{C}(=\text{O})$

[0369] 일부 실시 형태에서, Q는 테트라펩티드 잔기이다. 테트라펩티드의 아미노산은 천연 아미노산과 비천연 아미노산의 임의의 조합일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 테트라펩티드는 천연 아미노산을 포함한다. 링커가 카텡신 불안정성 링커인 경우, 테트라펩티드는 카텡신 매개 절단에 대한 작용 부위이다. 즉 테트라펩티드는 카텡신에 대한 인식 부위이다. 특히 관심 대상인 테트라펩티드 링커는 다음과 같다:

[0370] $\text{NH}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Gly}-\text{C}(=\text{O})$ 및

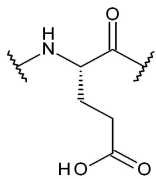
[0371] $\text{NH}-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{C}(=\text{O})$.

[0372] 일부 실시 형태에서, 테트라펩티드는 다음과 같다:

[0373] $\text{NH}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Gly}-\text{C}(=\text{O})$.

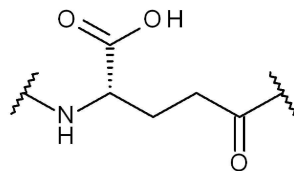
[0374] 펩티드 잔기의 상기 표현에서, NH -는 N-말단을 나타내고, $-\text{C}(=\text{O})$ 는 잔기의 C-말단을 나타낸다. C-말단은 A*의 NH에 결합한다.

[0375] Glu는 글루탐산의 잔기를 나타낸다. 즉:



[0376]

[0377] αGlu 는 α -사슬을 통해 결합될 때의 글루탐산의 잔기를 나타낸다. 즉:



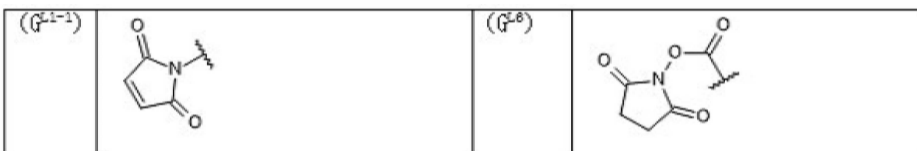
[0378]

[0379] 일 실시 형태에서, 아미노산 측쇄는 적절한 경우 화학적으로 보호된다. 측쇄 보호기는 상기 논의된 바와 같은 기일 수 있다. 보호된 아미노산 서열은 효소에 의해 절단될 수 있다. 예를 들어, Boc 측쇄-보호된 Lys 잔기를 포함하는 디펩티드 서열은 카텡신에 의해 절단될 수 있다.

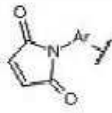
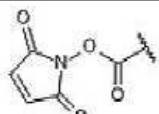
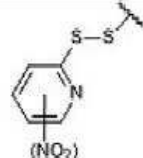
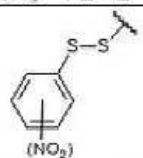
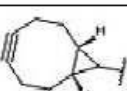
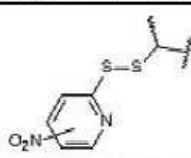
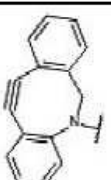
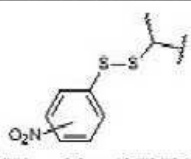
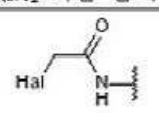
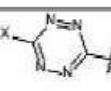
[0380] 아미노산의 측쇄에 대한 보호기는 당업계에서 잘 알려져 있고 Novabiochem 카탈로그에 기재되어 있으며, 전술된 바와 같다.

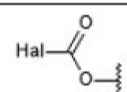
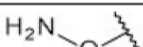
[0381] G^L

[0382] G^L 은 하기로부터 선택될 수 있다:



[0383]

(G^{L-2})		(G^{L-7})	
(G^{L-3})		(G^{L-8})	
(G^{L-5-1})	 (NO ₂ 기는 선택적임)	(G^{L-9})	
(G^{L-5-2})	 (NO ₂ 기는 선택적임)	(G^{L-10})	
(G^{L-5-3})	 (NO ₂ 기는 선택적임)	(G^{L-11})	
(G^{L-5-4})	 (NO ₂ 기는 선택적임)	(G^{L-12})	
(G^{L-4})	 (Hal = I, Br, Cl)	(G^{L-13})	

(G^{L-5})		(G^{L-14})	
-------------	---	--------------	---

(상기 표에서, Ar은 C₅₋₆ 아릴렌기, 예를 들어, 페닐렌을 나타내고, X는 C₁₋₄ 알킬을 나타냄).

일부 실시 형태에서, G^L은 G^{L1-1} 및 G^{L1-2}로부터 선택된다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, G^L은 G^{L1-1}이다.

G^{L1}

[0389] G^{LL} 은 하기로부터 선택될 수 있다:

(G^{LL1-1})		(G^{LL9-1})	
(G^{LL1-2})		(G^{LL9-2})	
(G^{LL2})		(G^{LL9-3})	
(G^{LL3-1})		(G^{LL9-4})	
(G^{LL3-2})		(G^{LL10})	

[0390]

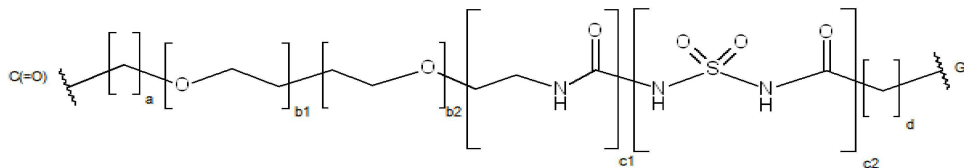
(G^{LL4})		(G^{LL11})	
(G^{LL5})		(G^{LL12})	
(G^{LL6})		(G^{LL13})	
(G^{LL7})		(G^{LL14})	

[0391] (상기 표에서, Ar은 C₅₋₆ 아릴렌기, 예를 들어, 페닐렌을 나타내고, X는 C₁₋₄ 알킬을 나타냄).

[0392] 일부 실시 형태에서, G^{LL} 은 G^{LL1-1} 및 G^{LL1-2} 로부터 선택된다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, G^{LL} 은 G^{LL1-1} 이다.

[0393] X

[0394] X는 바람직하게는 다음과 같다:



[0395]

[0396] ($a = 0$ 내지 5 이고, $b1 = 0$ 내지 16 이고, $b2 = 0$ 내지 16 이고, $c = 0$ 또는 1 이고, $d = 0$ 내지 5 이고, 적어도 $b1$ 또는 $b2 = 0$ 이고, 적어도 $c1$ 또는 $c2 = 0$ 임).

[0397] a 는 $0, 1, 2, 3, 4$, 또는 5 일 수 있다. 일부 실시 형태에서, a 는 0 내지 3 이다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, a 는 0 또는 1 이다. 추가 실시 형태에서, a 는 0 이다.

[0398] $b1$ 은 $0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15$ 또는 16 일 수 있다. 일부 실시 형태에서, $b1$ 은 0 내지 12 이다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, $b1$ 은 0 내지 8 이고, $0, 2, 3, 4, 5$ 또는 8 일 수 있다.

[0399] $b2$ 는 $0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15$ 또는 16 일 수 있다. 일부 실시 형태에서, $b2$ 는 0 내지 12 이다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, $b2$ 는 0 내지 8 이고, $0, 2, 3, 4, 5$ 또는 8 일 수 있다. 바람직하게는, $b1$ 과 $b2$ 중 하나만 0 이 아닐 수 있다.

[0400] $c1$ 은 0 또는 1 일 수 있다. $c2$ 는 0 또는 1 일 수 있다. 바람직하게는, $c1$ 과 $c2$ 중 하나만 0 이 아닐 수 있다.

[0401] d 는 $0, 1, 2, 3, 4$ 또는 5 일 수 있다. 일부 실시 형태에서, d 는 0 내지 3 이다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, d 는 1 또는 2 이다. 추가 실시 형태에서, d 는 2 이다. 추가 실시 형태에서, d 는 5 이다.

[0402] X의 일부 실시 형태에서, a 는 0 이고, $b1$ 은 0 이고, $c1$ 은 1 이고, $c2$ 는 0 이고, d 는 2 이고, $b2$ 는 0 내지 8 일 수 있다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, $b2$ 는 $0, 2, 3, 4, 5$, 또는 8 이다. X의 일부 실시 형태에서, a 는 1 이고, $b2$ 는 0 이고, $c1$ 은 0 이고, $c2$ 는 0 이고, d 는 0 이고, $b1$ 은 0 내지 8 일 수 있다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, $b1$ 은 $0, 2, 3, 4, 5$, 또는 8 이다. X의 일부 실시 형태에서, a 는 0 이고, $b1$ 은 0 이고, $c1$ 은 0 이고, $c2$ 는 0 이고, d 는 1 이고, $b2$ 는 0 내지 8 일 수 있다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, $b2$ 는 $0, 2, 3, 4, 5$, 또는 8 이다. X의 일부 실시 형태에서, $b1$ 은 0 이고, $b2$ 는 0 이고, $c1$ 은 0 이고, $c2$ 는 0 이고, a 와 d 중 하나는 0 이다. a 와 d 중 다른 하나는 1 내지 5 이다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, a 와 d 중 다른 하나는 1 이다. 이러한 실시 형태 중 다른 실시 형태에서, a 와 d 중 다른 하나는 5 이다. X의 일부 실시 형태에서, a 는 1 이고, $b2$ 는 0 이고, $c1$ 은 0 이고, $c2$ 는 1 이고, d 는 2 이고, $b1$ 은 0 내지 8 일 수 있다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, $b2$ 는 $0, 2, 3, 4, 5$, 또는 8 이다.

[0403] 일부 실시 형태에서, R^L 은 화학식 Ib의 R^L 이다. 일부 실시 형태에서, R^{LL} 은 화학식 Ib'의 R^{LL} 이다.

[0404] R^{L1} 및 R^{L2} 는 독립적으로 H 및 메틸로부터 선택되거나, 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 시클로프로필렌 또는 시클로부틸렌기를 형성할 수 있다.

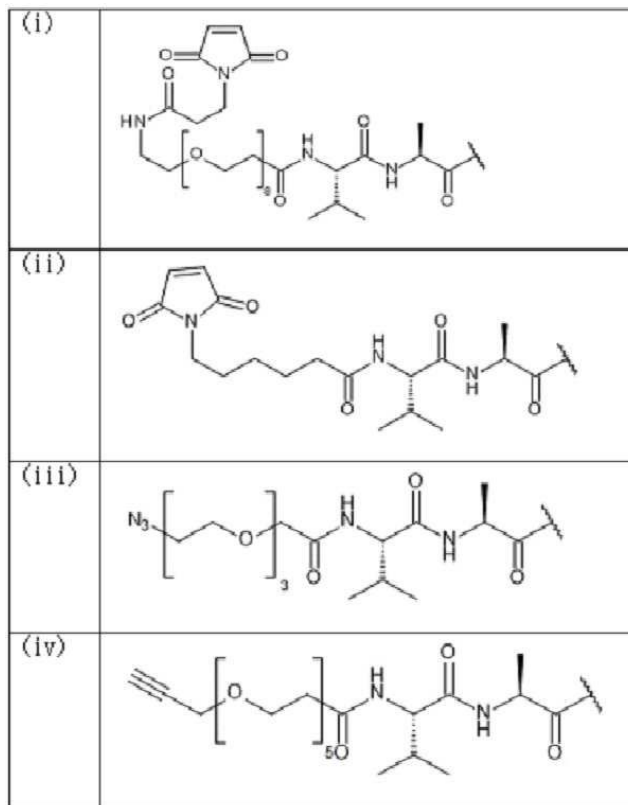
[0405] 일부 실시 형태에서, R^{L1} 및 R^{L2} 둘 다는 H이다. 일부 실시 형태에서, R^{L1} 은 H이고, R^{L2} 는 메틸이다. 일부 실시 형태에서, R^{L1} 및 R^{L2} 둘 다는 메틸이다.

[0406] 일부 실시 형태에서, R^{L1} 및 R^{L2} 는 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 시클로프로필렌기를 형성한다. 일부 실시 형태에서, R^{L1} 및 R^{L2} 는 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 시클로부틸렌기를 형성한다.

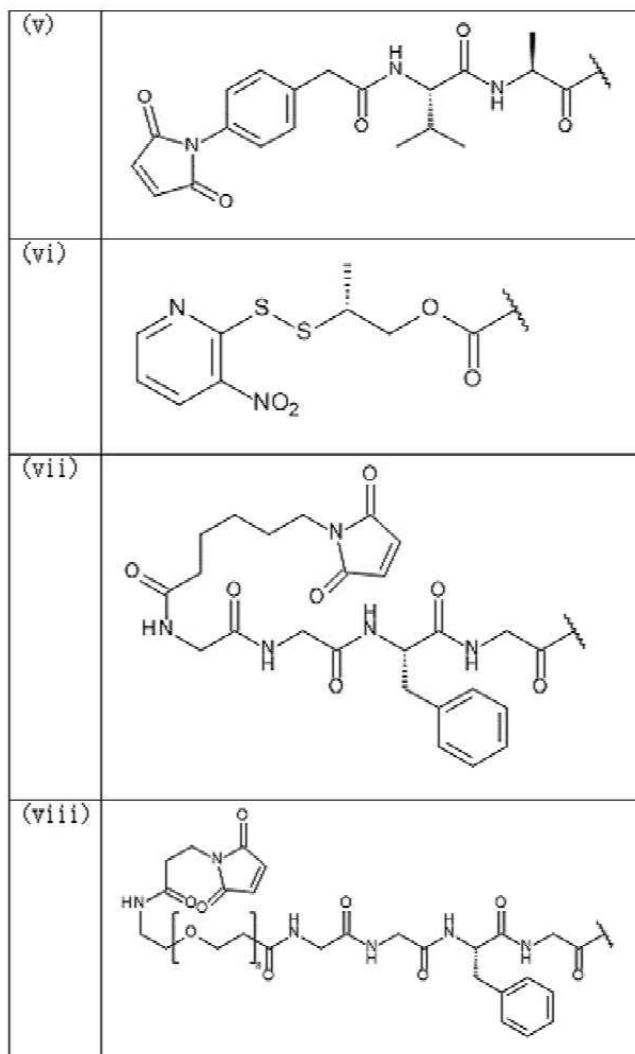
[0407] Ib 기의 일부 실시 형태에서, e 는 0 이다. 다른 실시 형태에서, e 는 1 이고, 니트로기는 고리의 임의의 이용 가능한 위치에 있을 수 있다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, 이는 오르토 위치에 있다. 이러한 실시 형태 중 다른 실시 형태에서, 이는 파라 위치에 있다.

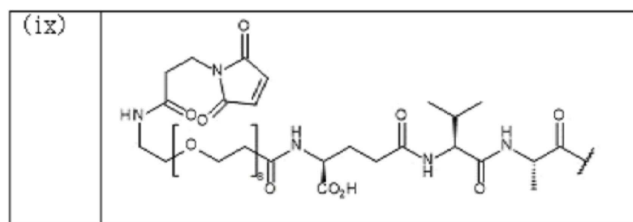
[0408] 본원에 기재된 화합물이 단일 거울상이성체 또는 거울상이성체 풍부 형태로 제공되는 일부 실시 형태에서, 거울상이성체 풍부 형태는 $60:40, 70:30, 80:20$ 또는 $90:10$ 초과 거울상이성체비를 갖는다. 추가 실시 형태에서, 거울상이성체비는 $95:5, 97:3$ 또는 $99:1$ 보다 크다.

[0409] 일부 실시 형태에서, R^L 은 하기로부터 선택된다:



[0410]

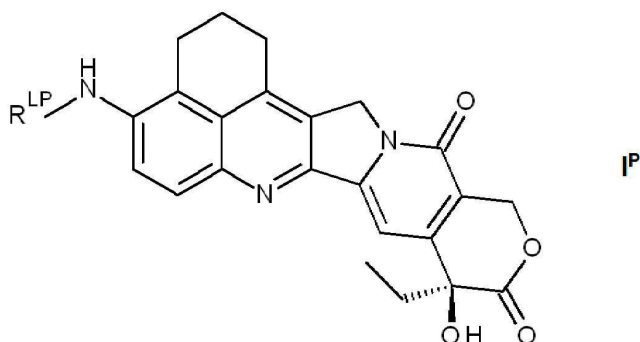




[0411] 일부 실시 형태에서, R^{LL} 은 상기 R^L 기로부터 유래된 기이다.

[0412] 바람직한 예를 상기에서 개략적으로 설명하였으므로, 특정 바람직한 토포이소머라제 I-링커(예를 들어, 약물 링커 단위) 화학식을 이제 설명한다.

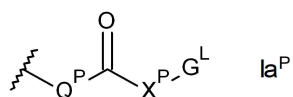
[0413] 일부 실시 형태에서, 화학식 I의 화합물은 화학식 I^P의 화합물:



[0414]

[0415] 및 이의 염 및 용매화물이고, 여기서 R^{LP} 는 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 연결하기 위한 링커이고, 여기서 상기 링커는 다음으로부터 선택된다:

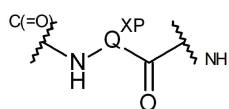
[0416] (ia):



[0417]

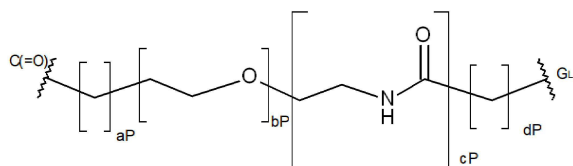
[0418] (상기 식에서,

[0419] Q^P 는



[0420] 이고, Q^{XP} 는 Q^P 가 아미노산 잔기, 디펩티드 잔기, 또는 트리펩티드 잔기가 되도록 하는 것이

[0421] X^P 는

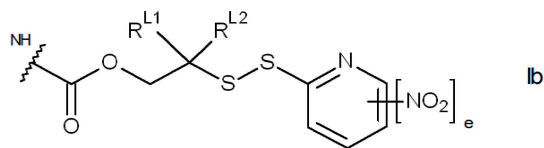


[0422]

[0423] 이고, aP = 0 내지 5이고, bP = 0 내지 16이고, cP = 0 또는 1이고, dP = 0 내지 5이고;

[0424] G^L 은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)에 연결하기 위한 링커임);

[0425] (ib):



[0426]

[0427] (상기 식에서, R^{L1} 및 R^{L2} 는 독립적으로 H 및 메틸로부터 선택되거나, 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 시클로프로필렌 또는 시클로부틸렌기를 형성하고;

[0428] e 는 0 또는 1임).

[0429] aP 는 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5일 수 있다. 일부 실시 형태에서, aP 는 0 내지 3이다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, aP 는 0 또는 1이다. 추가 실시 형태에서, aP 는 0이다.

[0430] bP 는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16일 수 있다. 일부 실시 형태에서, b 는 0 내지 12이다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, bP 는 0 내지 8이고, 0, 2, 4, 또는 8일 수 있다.

[0431] cP 는 0 또는 1일 수 있다.

[0432] dP 는 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5일 수 있다. 일부 실시 형태에서, dP 는 0 내지 3이다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, dP 는 1 또는 2이다. 추가 실시 형태에서, dP 는 2이다.

[0433] X^P 의 일부 실시 형태에서, aP 는 0이고, cP 는 1이고, dP 는 2이고, bP 는 0 내지 8일 수 있다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, bP 는 0, 4, 또는 8이다.

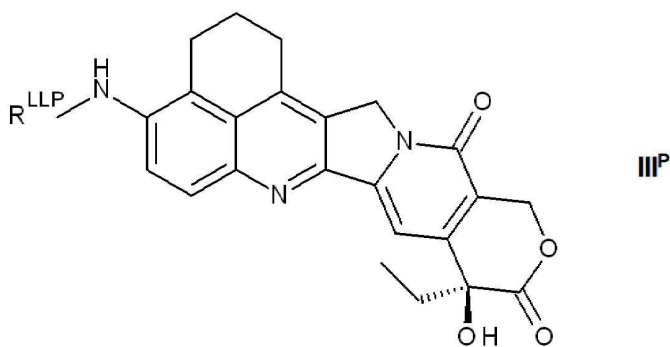
[0434] 화학식 I의 화합물에 대한 상기 Q^X 에 대한 바람직한 예는 (예를 들어, 적절한 경우) Q^{XP} 에 적용될 수 있다.

[0435] 화학식 I의 화합물에 대한 상기 G^L , R^{L1} , R^{L2} , 및 e 에 대한 바람직한 예는 화학식 I^P의 화합물에 적용될 수 있다.

[0436] 일부 실시 형태에서, 화학식 IV의 접합체는 화학식 IV^P의 접합체:

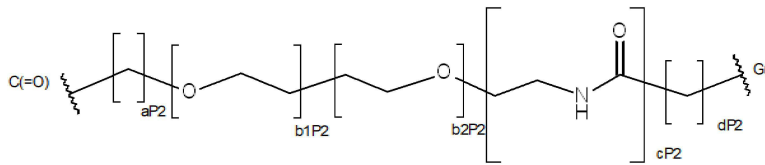
[0437] $L - (D^{LP})_p[\text{화학식 IV}^P]$

[0438] 또는 이의 제약상 허용 가능한 염 또는 용매화물이고, 여기서 L 은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)이고, D^{LP} 는 화학식 III^P의 토포이소머라제 I 억제제(예를 들어, 약물 링커 단위):



[0439] 이고;

[0440] R^{LLP} 는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)에 연결된 링커이고, 여기서 상기 링커는 다음으로부터 선택된다:



[0457]

이고,

[0458]

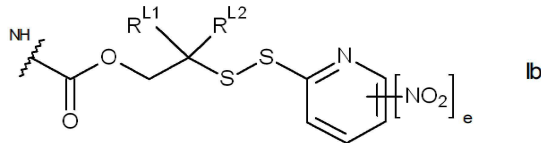
이때 aP2 = 0 내지 5이고, b1P2 = 0 내지 16이고, b2P2 = 0 내지 16이고, cP2 = 0 또는 1이고, dP2 = 0 내지 5이고, 적어도 b1P2 또는 b2P2 = 0(즉, b1과 b2 중 하나만 0이 아닐 수 있음)이고;

[0459]

G^L은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)에 연결하기 위한 링커임);

[0460]

(ib):



[0461]

[0462]

(상기 식에서, R^{L1} 및 R^{L2}는 독립적으로 H 및 메틸로부터 선택되거나, 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 시클로프로필렌 또는 시클로부틸렌기를 형성하고;

[0463]

e는 0 또는 1임).

[0464]

aP2는 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5일 수 있다. 일부 실시 형태에서, aP2는 0 내지 3이다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, aP2는 0 또는 1이다. 추가 실시 형태에서, aP2는 0이다.

[0465]

b1P2는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16일 수 있다. 일부 실시 형태에서, b1P2는 0 내지 12이다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, b1P2는 0 내지 8이고, 0, 2, 3, 4, 5 또는 8일 수 있다.

[0466]

b2P2는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16일 수 있다. 일부 실시 형태에서, b2P2는 0 내지 12이다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, b2P2는 0 내지 8이고, 0, 2, 3, 4, 5 또는 8일 수 있다.

[0467]

바람직하게는, b1P2과 b2P2 중 하나만 0이 아닐 수 있다.

[0468]

cP2는 0 또는 1일 수 있다.

[0469]

dP2는 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5일 수 있다. 일부 실시 형태에서, dP2는 0 내지 3이다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, dP2는 1 또는 2이다. 추가 실시 형태에서, dP2는 2이다. 추가 실시 형태에서, dP2는 5이다.

[0470]

X^{P2}의 일부 실시 형태에서, aP2는 0이고, b1P2는 0이고, cP2는 1이고, dP2는 2이고, b2P2는 0 내지 8일 수 있다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, b2P2는 0, 2, 3, 4, 5, 또는 8이다. X^{P2}의 일부 실시 형태에서, aP2는 1이고, b2P2는 0이고, cP2는 0이고, dP2는 0이고, b1P2는 0 내지 8일 수 있다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, b1P2는 0, 2, 3, 4, 5, 또는 8이다. X^{P2}의 일부 실시 형태에서, aP2는 0이고, b1P2는 0이고, cP2는 0이고, dP2는 1이고, b2P2는 0 내지 8일 수 있다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, b2P2는 0, 2, 3, 4, 5, 또는 8이다. X^{P2}의 일부 실시 형태에서, b1P2는 0이고, b2P2는 0이고, cP2는 0이고, aP2와 dP2 중 하나는 0이다. aP2와 d 중 다른 하나는 1 내지 5이다. 이러한 실시 형태 중 일부에서, aP2와 d 중 다른 하나는 1이다. 이러한 실시 형태 중 다른 실시 형태에서, aP2와 dP2 중 다른 하나는 5이다.

[0471]

화학식 I의 화합물에 대한 상기 Q^X에 대한 바람직한 예는 (예를 들어, 적절한 경우) 화학식 Ia^{P2}의 Q^X에 적용될 수 있다.

[0472]

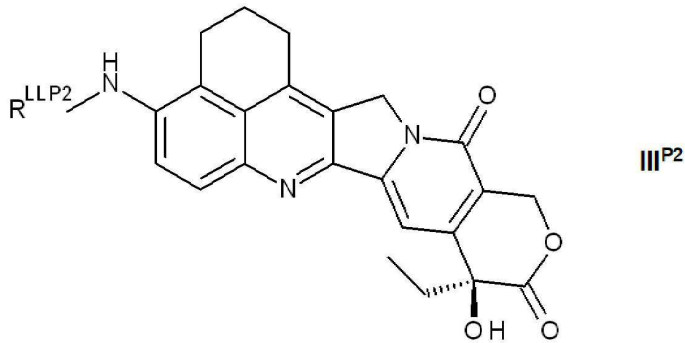
화학식 I의 화합물에 대한 상기 G^L, R^{L1}, R^{L2}, 및 e에 대한 바람직한 예는 화학식 I^{P2}의 화합물에 적용될 수 있다.

[0473]

일부 실시 형태에서, 화학식 IV의 접합체는 화학식 IV^{P2}의 접합체:

[0474] $L - (D^{LP2})_p[\text{화학식 IV}^{P2}]$

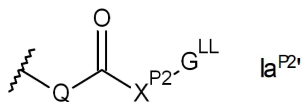
[0475] 또는 이의 제약상 허용 가능한 염 또는 용매화물이고, 여기서 L은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)이고, D^{LP2} 는 화학식 III^{P2}의 토포이소머라제 I 억제제(예를 들어, 약물 링커 단위):



[0476] 이고;

[0477] R^{LLP2} 는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 리간드 단위)에 연결된 링커이고, 여기서 상기 링커는 다음으로부터 선택된다:

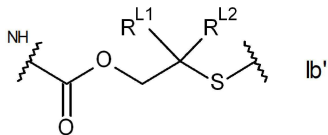
[0478] (ia'):



[0479]

[0480] (Q 및 X^{P2}는 상기에 정의된 바와 같고, G^{LL}은 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 연결된 링커임); 및

[0481] (ib'):

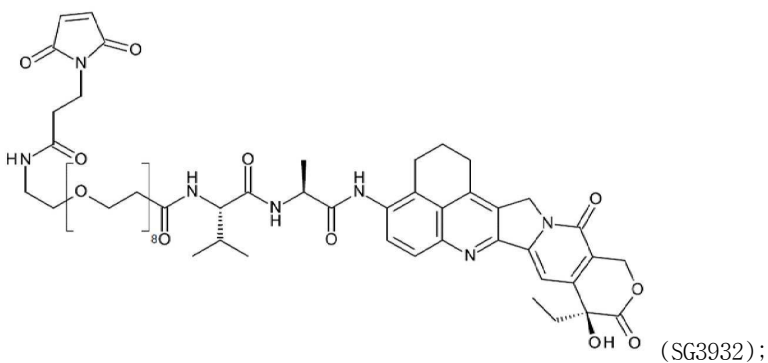


[0482]

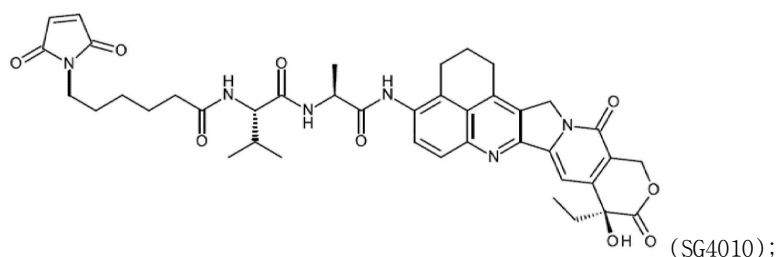
[0483] (R^{L1} 및 R^{L2}는 상기에 정의된 바와 같고;

[0484] p는 1 내지 20의 정수임).

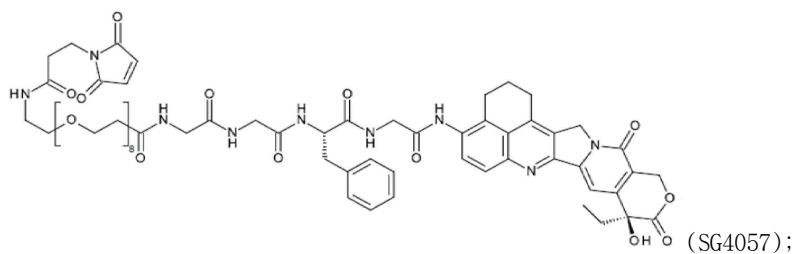
[0485] 특히 적합한 토포이소머라제 I 억제제는 하기 화학식을 갖는 것을 포함한다:



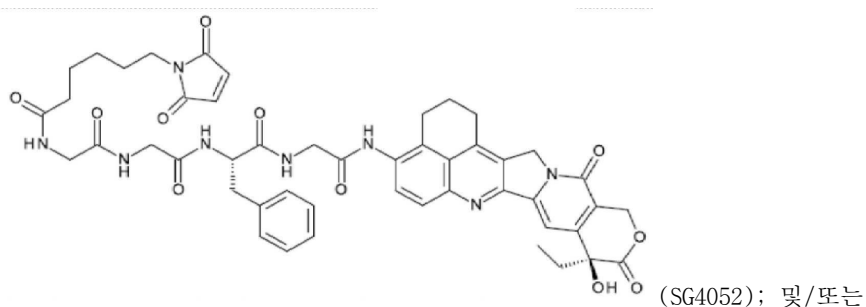
[0486] (SG3932);



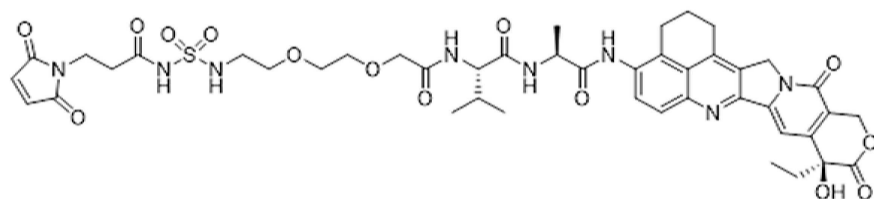
[0487]



[0488]



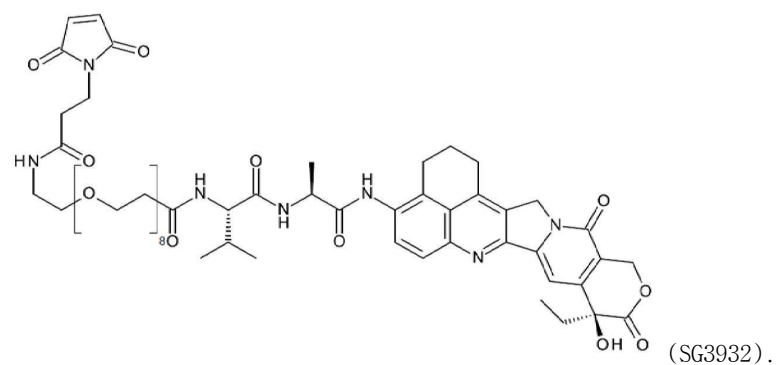
[0489]



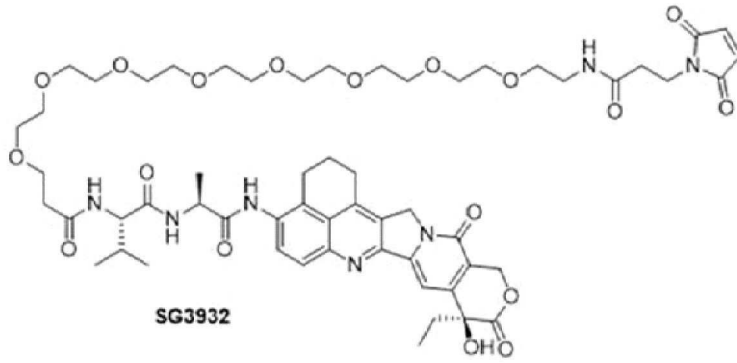
[0490]

[0491] SG3932가 특히 바람직하다. 따라서, 바람직한 실시 형태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기 화학식을 갖는 토포이소머라제 I 억제제(예를 들어, SG3932)에 접합된다:

[0492]



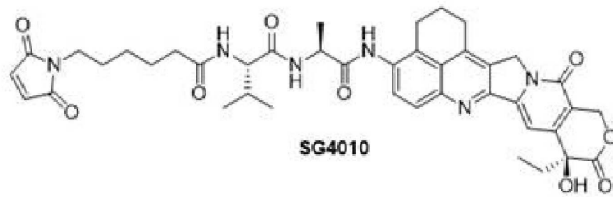
[0493] 의심의 여지를 없애기 위해 숫자 '8'은 괄호 안의 구조가 8번 반복됨을 나타낸다. 따라서, SG3932의 또 다른 표현은 다음과 같다:



[0494]

[0495]

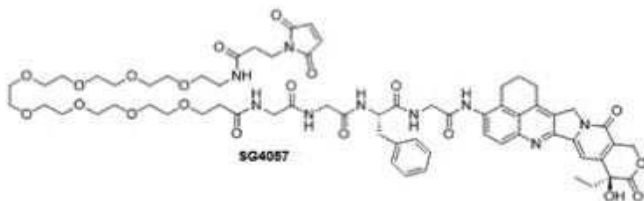
SG4010의 또 다른 표현은 다음과 같다:



[0496]

[0497]

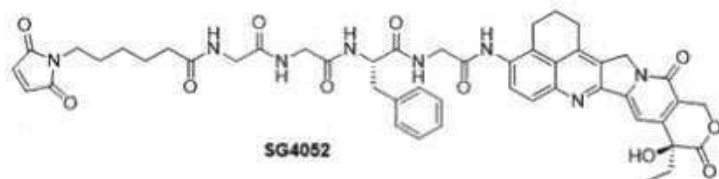
SG4057의 또 다른 표현은 다음과 같다:



[0498]

[0499]

SG4052의 또 다른 표현은 다음과 같다:



[0500]

[0501]

본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 상기 토포이소머라제 I 억제제(들)에 접합될 수 있다.

[0502]

바람직한 양태에서, B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되며, 이는

[0503]

i. 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 또는 이의 기능적 변이체;

[0504]

ii. 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 또는 이의 기능적 변이체;

[0505]

iii. 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;

[0506]

iv. 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 또는 이의 기능적 변이체;

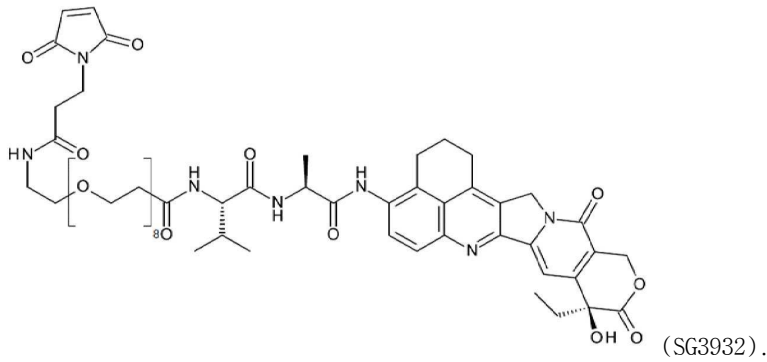
[0507]

v. 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 또는 이의 기능적 변이체; 및

[0508]

vi. 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고,

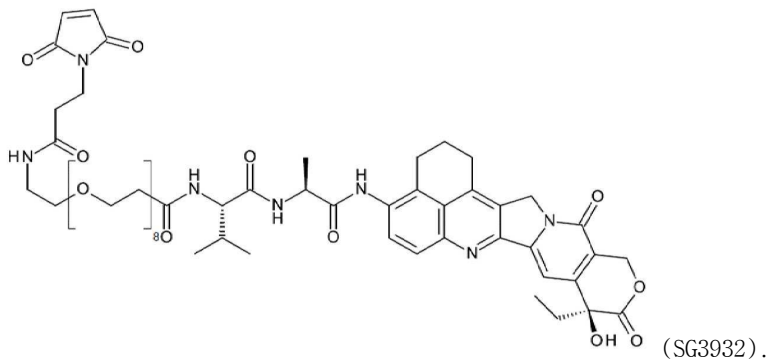
[0509] 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 SG3932에 접합된다:



[0510]

[0511] 또 다른 바람직한 양태는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하며, 이는 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고,

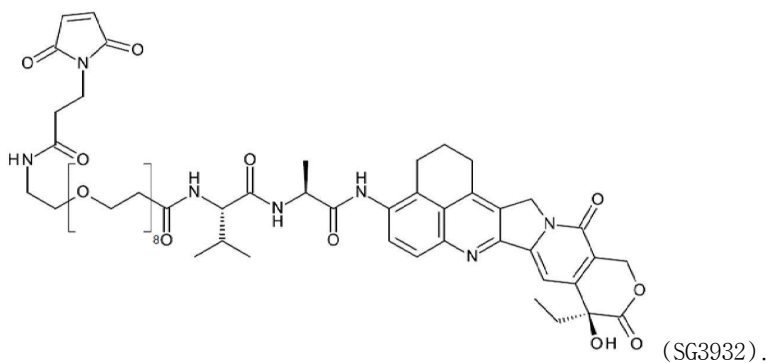
[0512] 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 SG3932에 접합된다:



[0513]

[0514] 특히 바람직한 양태는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하며, 이는 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고,

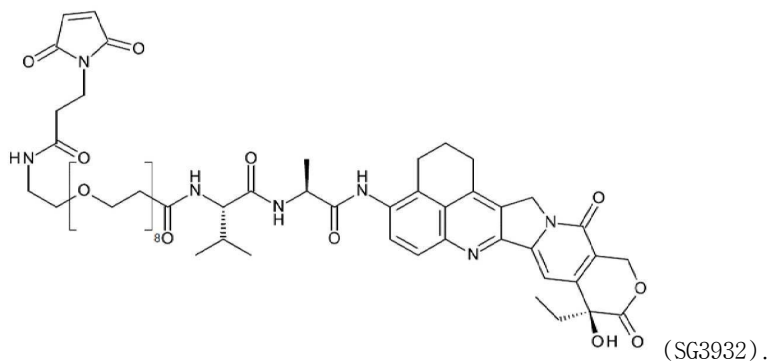
[0515] 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 SG3932에 접합된다:



[0516]

[0517] 또 다른 바람직한 양태는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하며, 이는 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고,

[0518] 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 SG3932에 접합된다:

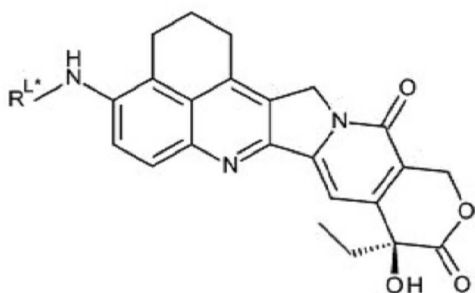


토포이소머라제 I 억제제의 합성

완성을 위하여, 바람직한 토포이소머라제 I 억제제(들)의 제조를 위한 특정 일반 합성 경로를 이제 설명한다. 추가의 자세한 내용은 실시예 섹션에서 찾을 수 있다.

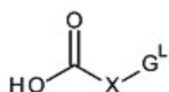
R^L 이 화학식 Ia의 R^L 인 화학식 I의 화합물은 화학식 2의 화합물:

[화학식 2]



(상기 식에서, R^{L*} 은 -QH임)을 사용하여, 화학식 3의 화합물:

[화학식 3]

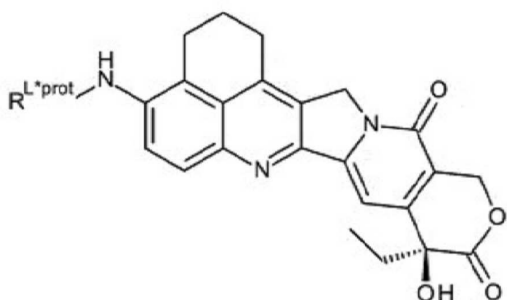


또는 이의 활성화 버전을 연결함으로써 합성될 수 있다.

이러한 반응은 아미드 커플링 조건 하에서 수행될 수 있다.

화학식 2의 화합물은 화학식 4의 화합물을 탈보호함으로써 합성될 수 있다:

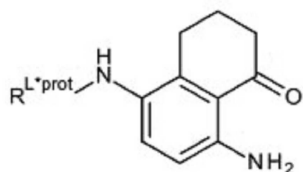
[화학식 4]



[0533] (상기 식에서, R^{L*prot} 는 $-Q-Prot^N$ 이고, $Prot^N$ 은 아민 보호기임).

[0534] 화학식 4의 화합물은 Friedlander 반응을 이용하여 화학식 5의 화합물:

[0535] [화학식 5]

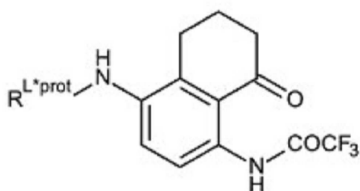


[0536]

[0537] 을 화합물 A3과 커플링함으로써 합성될 수 있다.

[0538] 화학식 5의 화합물은 화학식 6의 화합물:

[0539] [화학식 6]



[0540]

[0541] 로부터 트리플루오로아세트아미드 보호기를 제거하여 합성될 수 있다.

[0542] 화학식 6의 화합물은 $R^{L*prot}-OH$ 를 화합물 I7에 커플링시킴으로써 합성될 수 있다.

[0543] R^L 이 화학식 1a 또는 1b의 R^L 인 화학식 I의 화합물은 화합물 R^L-OH 또는 이의 활성화된 형태의 커플링에 의해 화합물 I11로부터 합성될 수 있다.

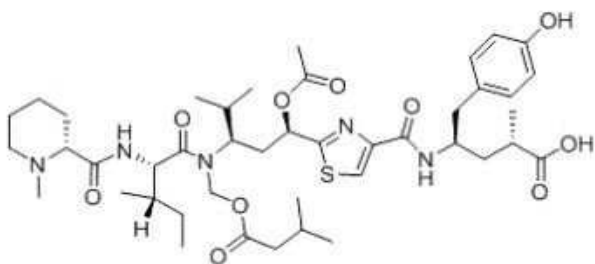
[0544] 아민 보호기:

[0545] 아민 보호기는 당업자에게 잘 알려져 있다. 자세한 내용은 문헌[Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis, Fourth Edition, John Wiley & Sons, 2007 (ISBN 978-0-471-69754-1), 페이지 696-871]의 적합한 보호기의 개시를 참조한다.

[0546] 추가 ADC

[0547] 위에서 개략적으로 설명한 바와 같이 토포이소머라제 I 억제제가 바람직하지만, 임의의 적합한 작용제(예를 들어, 약물/세포독소)가 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 연결될 수 있음을 주목해야 한다. 기타 적합한 작용제의 예는 아래에 개략적으로 설명되어 있다.

[0548] 일 실시 형태에서, 세포독소는 튜블라이신 또는 튜블라이신 유도체이다. 일 실시 형태에서, 세포독소는 다음의 화학 구조를 갖는 튜블라이신 A이다:

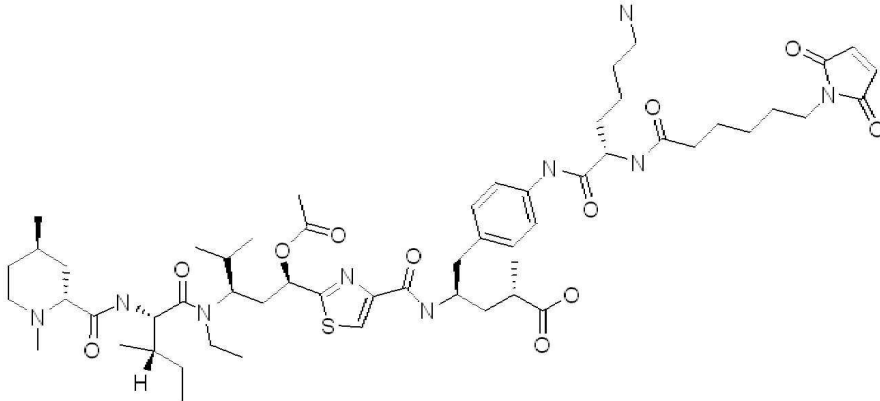


[0549]

[0550] 튜블라이신은 점액세균 종으로부터 분리된 천연 생성물 부류의 구성원이다. 세포골격 상호작용 물질로서, 튜블라이신은 튜블린 중합을 억제하고 세포 주기 정지 및 세포자멸사를 유도하는 유사분열 저해물질이다. 본원에서

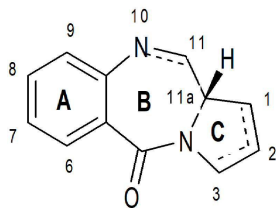
사용되는 용어 "튜블라이신"은 자연적으로 발생하는 튜블라이신 및 튜블라이신의 유사체 및 유도체를 집합적으로 및 개별적으로 지칭한다. 튜블라이신의 실례가 되는 예는 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는, WO 2004005326A2, WO 2012019123A1, WO 2009134279A1, WO 2009055562A1, WO 2004005327A1, US7776841, US7754885, US20100240701, US7816377, US20110021568 및 US20110263650에 개시되어 있다. 이러한 유도체는 예를 들어, 하나 이상의 보호 또는 보호기, 하나 이상의 연결 모이어티를 포함하는 튜블라이신 전구약물 또는 튜블라이신을 포함하는 것으로 이해된다.

[0551] 일 실시 형태에서, 세포독소는 본원에서 "AZ1508"로도 지칭되며 본원에 참조로 포함되는 WO 2015157594에 더욱 상세하게 기재되었고 다음의 구조를 갖는 튜블라이신 1508이다:



[0552]

[0553] 또 다른 실시 형태에서, 이러한 세포독소는 피롤로벤조디아제핀(PBD) 또는 PBD 유도체일 수 있다. PBD는 핵으로 자리를 옮겨, 그곳에서 DNA를 교차 결합시켜, 유사분열 중에 복제를 방지하고, 단일 가닥 절단을 유도하여 DNA를 손상시키고, 이어서 세포자멸사를 초래한다. 일부 PBD는 DNA의 특정 서열을 인식하고 이에 결합할 수 있는 능력이 있다. 바람직한 서열은 PuGPu이다. PBD는 하기 일반 구조를 가진다:

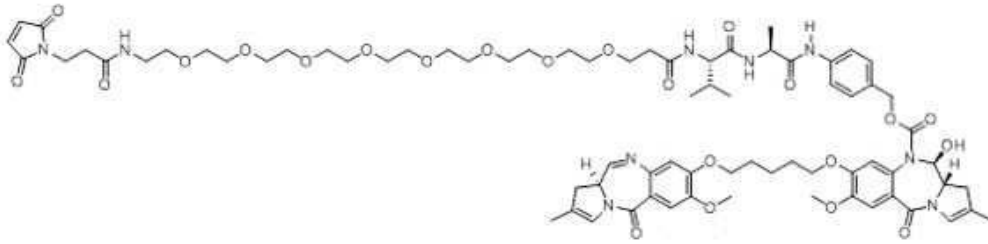


[0554]

[0555] PBD들은 방향족 A 고리 및 피롤로 C 고리에서 치환기의 수, 유형 및 위치가 상이하며, C 고리의 포화도가 상이하다. B 고리에는 DNA의 알킬화를 담당하는 친전자성 중심인 N10-C11 위치에 이민(N=C), 카르비놀아민(NH-CH(OH)) 또는 카르비놀아민 메틸 에테르(NH-CH(OMe))가 존재한다. 모든 알려진 천연 산물들이 키랄 C11a 위치에서 (S)-배열을 가지며 이것은 C 고리로부터 A 고리를 향해 볼 때 우선편(right-handed twist)을 그들에게 제공한다. 이는 그들에게 B-형태 DNA의 마이너 그루브(minor groove)와의 이소헬리시티(isohelicity)를 위한 적절한 3차원 형상을 제공하여, 결합 부위에서의 스너그 핏(snug fit)을 초래한다. 마이너 그루브에서 부가물을 형성하는 능력 덕분에 이들은 DNA 프로세싱을 방해할 수 있게 되어 항종양제로서 사용이 가능하다.

[0556] 최초의 PBD 항종양 항생제인 안트라마이신은 1965년에 발견되었다. 그 이후로 많은 자연 발생 PBD가 보고되었으며, 다양한 유사체에 대해 10개가 넘는 합성 경로가 개발되었다. 패밀리 구성원은 에비마이신, 치카마이신, DC-81, 마제트라마이신, 네오텐트라마이신 A 및 B, 포르트라마이신, 포르트라카르신, 시바노미신(DC-102), 시비로마이신 및 토마마이신을 포함한다. PBD 및 이를 포함하는 ADC는 또한 WO 2015/155345 및 WO 2015/157592에 기재되어 있으며, 이들은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0557] 일 실시 형태에서, 세포독소는 본원에서 "SG3249"로도 지칭되며 본원에 참조로 포함되는 WO 2014/057074에 더욱 상세하게 기재되었고 다음의 구조를 갖는 PBD 3249이다:



[0558]

[0559] 따라서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 피롤로벤조디아제핀 SG3249 세포독소에 접합된다.

[0560] 예를 들어, 일 양태에서, B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되며, 이는

[0561] i. 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 또는 이의 기능적 변이체;

[0562] ii. 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 또는 이의 기능적 변이체;

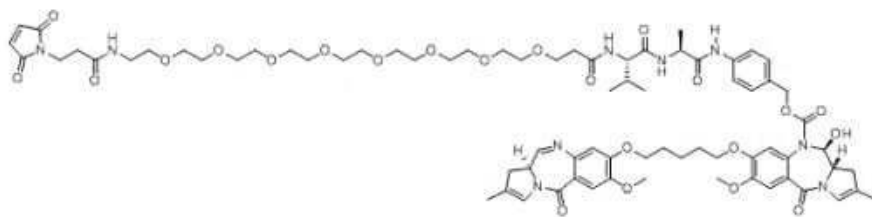
[0563] iii. 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;

[0564] iv. 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 또는 이의 기능적 변이체;

[0565] v. 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 또는 이의 기능적 변이체; 및

[0566] vi. 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체를 포함하고,

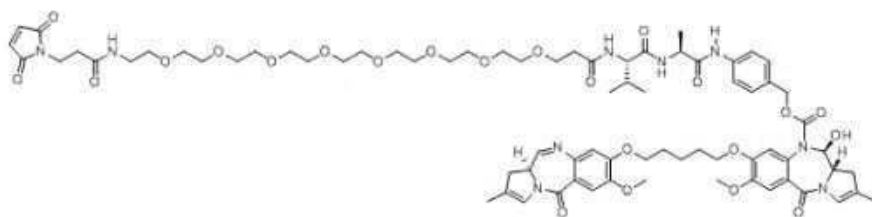
[0567] 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 피롤로벤조디아제핀 SG3249 세포독소에 접합된다:



[0568]

(SG3249).

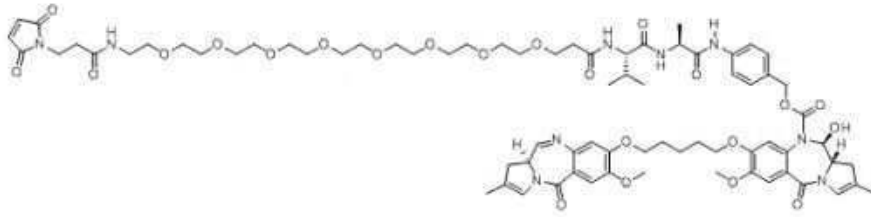
[0569] 또 다른 양태에서, B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되며, 이는 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 피롤로벤조디아제핀 SG3249 세포독소에 접합된다:



[0570]

(SG3249).

[0571] 또 다른 양태에서, B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되며, 이는 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 이의 기능적 변이체; 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄, 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 피롤로벤조디아제핀 SG3249 세포독소에 접합된다:

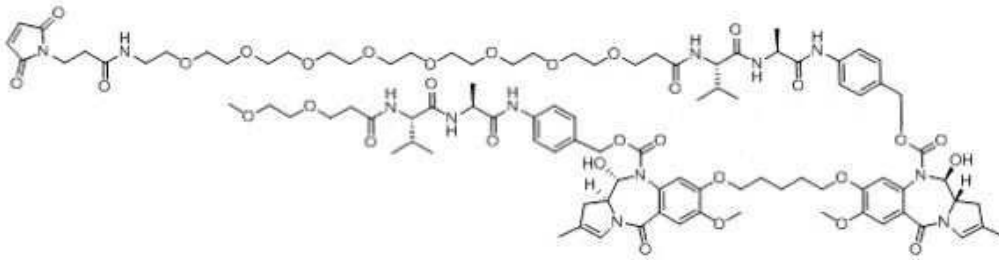


(SG3249).

[0572]

[0573]

일 실시 형태에서, 세포독소는 본원에서 "SG3315"로도 지칭되며 본원에 참조로 포함되는 WO 2015/052322에 더욱 상세하게 기재되었고 다음의 구조를 갖는 PBD 3315이다:



[0574]

[0575]

항체 또는 이의 항원 결합 단편은 바람직하게는 시스테인 잔기를 통해 피롤로벤조디아제핀 SG3249 세포독소에 접합된다.

[0576]

본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 접합의 부위-특이적 또는 부위-비특이적 방법을 사용하여 이중 작용제(바람직하게는 세포독소)에 접합될 수 있다. 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상의 치료적 모이어티를 포함한다. 일 실시 형태에서, 모든 치료적 모이어티는 동일하다.

[0577]

전통적인 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 접합 전략은 라이신 또는 시스테인을 통한 항체 또는 단편에 페이로드를 임의로 접합시키는 것에 의존한다. 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 예를 들어, 항체 또는 단편의 부분적인 환원에 이어, 부착된 링커 모이어티가 있거나 없는, 원하는 작용제와의 반응에 의해, 이중 작용제(바람직하게는 세포독소)에 임의로 접합된다. 항체 또는 단편은 DTT 또는 유사한 환원제를 이용하여 환원시킬 수 있다. 그런 다음, 부착된 링커 모이어티가 있거나 없는 이러한 작용제는 DMSO의 존재 하에 환원된 항체 또는 단편에 물 과량으로 첨가될 수 있다. 접합 후, 과량의 유리 시스테인이 미반응 작용제를 퀀칭하도록 첨가될 수 있다. 그런 다음, 반응 혼합물을 정제하고, PBS로 완충제 교환할 수 있다.

[0578]

일 실시 형태에서, 작용제(예를 들어, 세포독소)는 부위-특이적 접합에 의해 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 접합된다. 일 실시 형태에서, 특정 위치의 반응성 아미노산 잔기들을 이용하는 항체에 대한 치료적 모이어티의 부위 특이적인 접합은 균일한 화학량론으로 균질한 ADC 제제를 산출한다.

[0579]

이러한 부위 특이적인 접합은 시스테인, 잔기 또는 비 자연적 아미노산을 통한 것일 수 있다. 바람직한 실시 형태에서, 이중 작용제(바람직하게는 세포독소)는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 통해 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 접합된다.

[0580]

일 실시 형태에서, 이중 작용제(바람직하게는 세포독소)는 (바람직하게는 Fc 영역의 특정 카뮈 위치의) 아미노산의 측쇄에 화학적으로 접합된다. 일 실시 형태에서, 작용제(예를 들어, 세포독성제 또는 영상화 작용제)는 위치 239, 248, 254, 273, 279, 282, 284, 286, 287, 289, 297, 298, 312, 324, 326, 330, 335, 337, 339, 350, 355, 356, 359, 360, 361, 375, 383, 384, 389, 398, 400, 413, 415, 418, 422, 440, 441, 442, 443 및 446 중 적어도 하나의 시스테인 치환을 통해 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 접합되는데, 이러한 넘버링은 카뮈의 EU 인덱스에 해당한다. 일 실시 형태에서, 특정 카뮈 위치는 239, 442, 또는 둘 다이다. 일 실시 형태에서, 특정 위치는 카뮈 위치 442, 카뮈 위치 239와 240 사이의 아미노산 삽입, 또는 둘 다이다. 일 실시 형태에서, 이중 작용제(바람직하게는 세포독소)는 티올-말레이미드 연결을 통해 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 접합된다. 일부 양태에서, 아미노산 측쇄는 설프하이드릴 측쇄이다.

[0581]

일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, 바람직하게는 VL 및 불변 경쇄를 포함하는) 경쇄 및 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, VH 및 불변 중쇄를 포함하는) 중쇄를 포함하고, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 피롤로벤조디아제핀 SG3249 세포독소에 접합되고, 바람직하게는 피롤로벤조디아제핀 SG3249 세포독소는 상기 중쇄의 아미노산 위치 240의 시스테인

인 잔기에 접합된다.

- [0582] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, 바람직하게는 VL 및 불변 경쇄를 포함하는) 경쇄 및 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 (예를 들어, VH 및 불변 중쇄를 포함하는) 중쇄를 포함하고, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 피롤로벤조디아제핀 SG3249 세포독소에 접합된다.
- [0583] 본원에서 세포독소에 접합된 항체 또는 항원 결합 단편에 대한 언급은 용어 "항체 약물 접합체(ADC)" 또는 "항-B7-H4 ADC"와 동의어이다.
- [0584] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 항-B7-H4 ADC)은 세포독성 페이로드를 세포(바람직하게는 B7-H4 발현 세포)에 전달하고 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 항-B7-H4 ADC)의 부재 하에서의 억제 또는 저해 수준에 비해 적어도 10%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90% 또는 약 100%(바람직하게는 적어도 40%)만큼 (예를 들어, 중양의) 증식을 억제하거나 저해한다. 세포 증식은 세포 분열의 속도, 및/또는 세포 분열을 거치는 세포 집단 내의 세포의 비율, 및/또는 말기 분화 또는 세포 사망(예컨대, 티미딘 도입)으로 인한 세포 집단으로부터의 세포 소실 속도를 측정하는 당해 분야에서 인정된 기법을 이용하여 분석할 수 있다.
- [0585] 일 실시 형태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 단편(예를 들어, 항-B7-H4 ADC)은 세포 표면 상의 B7-H4와 결합하고, 세포 내로 내재화된다. 일 실시 형태에서, 항원 또는 이의 항체 단편은 약 100 ng/ml 내지 약 1 μ g/ml, 약 100 ng/ml 내지 약 500 ng/ml, 약 100 ng/ml 내지 약 250 ng/ml, 약 250 ng/ml 내지 약 500 ng/ml, 약 350 ng/ml 내지 약 450 ng/ml, 약 500 ng/ml 내지 약 1 μ g/ml, 약 500 ng/ml 내지 약 750 ng/ml, 약 750 ng/ml 내지 약 850 ng/ml, 또는 약 900 ng/ml 내지 약 1 μ g/ml의 10분에서의 IC50으로 세포(바람직하게는 B7-H4 발현 세포) 내로 내재화된다.
- [0586] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 단편(예를 들어, 항-B7-H4 ADC)은 약 100 ng/ml 내지 약 1 μ g/ml, 약 100 ng/ml 내지 약 500 ng/ml, 약 100 ng/ml 내지 약 250 ng/ml, 약 250 ng/ml 내지 약 500 ng/ml, 약 250 ng/ml 내지 약 350 ng/ml, 약 350 ng/ml 내지 약 450 ng/ml, 약 500 ng/ml 내지 약 1 μ g/ml, 약 500 ng/ml 내지 약 750 ng/ml, 약 750 ng/ml 내지 약 850 ng/ml, 또는 약 900 ng/ml 내지 약 1 μ g/ml의 30분에서의 IC50으로 세포(바람직하게는 B7-H4 발현 세포) 내로 내재화된다.
- [0587] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 단편(예를 들어, 항-B7-H4 ADC)은 약 50 ng/ml 내지 약 500 ng/ml, 약 50 ng/ml 내지 약 100 ng/ml, 약 100 ng/ml 내지 약 200 ng/ml, 약 200 ng/ml 내지 약 300 ng/ml, 약 300 ng/ml 내지 약 400 ng/ml, 또는 약 400 ng/ml 내지 약 500 ng/ml의 120분에서의 IC50으로 세포(바람직하게는 B7-H4 발현 세포) 내로 내재화된다.
- [0588] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 단편(예를 들어, 항-B7-H4 ADC)은 약 5 ng/ml 내지 약 250 ng/ml, 약 10 ng/ml 내지 약 25 ng/ml, 약 25 ng/ml 내지 약 50 ng/ml, 약 50 ng/ml 내지 약 100 ng/ml, 약 100 ng/ml 내지 약 150 ng/ml, 약 150 ng/ml 내지 약 200 ng/ml, 또는 약 200 ng/ml 내지 약 250 ng/ml의 8시간에서의 IC50으로 세포(바람직하게는 B7-H4 발현 세포) 내로 내재화된다.
- [0589] 의심의 여지를 없애기 위해, 본원에서 "접합체"에 대한 언급은 상기 기재된 임의의 이러한 작용제를 포함하는 이중 작용제(바람직하게는 세포독소)에 접합된 항체 또는 항원 결합 단편을 의미한다.
- [0590] 상기 기재된 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편의 치료적 적용에 더하여, 본 발명의 "접합체"는 또한 치료 방법에 사용될 수 있다. 따라서, 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 본원에 기재된 접합체(예를 들어, 화학식 IV의 접합체)를 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법이 또한 제공된다. 용어 "치료적 유효량"은, 환자에게 유익을 나타내기 위해 충분한 양이다. 이러한 유익은 하나 이상의 증상에 대한 적어도 완화된 수 있다. 실제 투여량, 투여 속도, 및 시간-과정은 치료 대상의 성질 및 증증도에 따라 다를 것이다. 치료의 처방, 예를 들어, 투여량에 대한 결정은 일반 의사 및 다른 의사의 책임하에 있다.
- [0591] 접합체는 치료될 질병에 따라 단독으로 또는 다른 치료와 병행하여 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 치료 및 요법의 예는 화학요법(예를 들어, 약물을 포함한 활성제의 투여); 수술; 및 방사선 요법을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0592] 본 발명에 따른, 그리고 본 발명에 따라 사용하기 위한 제약 조성물은 활성 성분, 즉 본 발명의 접합체/ADC(예를 들어, 화학식 IV) 이외에, 제약상 허용 가능한 부형제, 담체, 완충제, 안정화제 또는 당업자에게 잘 알려진

기타 물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질은 무독성이어야 하고, 활성 성분의 효능을 방해하지 않아야 한다. 담체 또는 다른 물질의 정확한 성질은 경구 또는 주사, 예를 들어 피부, 피하 또는 정맥내 주사일 수 있는 투여의 경로에 따라 달라질 것이다.

[0593] 경구 투여용 제약 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 또는 액체 형태일 수 있다. 정제는 고체 담체 또는 보조제를 포함할 수 있다. 액상 제약 조성물은 일반적으로 액상 담체, 예컨대 물, 식유, 동물성 또는 식물성 오일, 광유, 또는 합성 오일을 포함한다. 생리 식염수, 텍스트로스, 또는 다른 당류 용액, 또는 글리콜, 예컨대 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 또는 폴리에틸렌 글리콜이 포함될 수 있다. 캡슐은 젤라틴과 같은 고체 담체를 포함할 수 있다.

[0594] 정맥내, 피부, 또는 피하 주사, 또는 환부 주사의 경우에, 활성 성분은 무발열원이고, 적합한 pH, 등장성, 및 안정성을 갖는 비경구적으로 허용 가능한 수용액의 형태일 것이다. 당업자는 예를 들어, 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 락테이트 첨가 링거 주사액와 같은 등장성 비히클을 사용하여 적합한 용액을 적절하게 제조할 수 있다. 보존제, 안정화제, 완충제, 산화방지제, 및/또는 다른 첨가제는 필요에 따라 포함될 수 있다.

[0595] 바람직하게는, 접합체는 증식성 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 용어 "증식성 질환"은 시험관 내 또는 생체 내 어느 곳에서든 신생물 또는 과형성 성장과 같은 바람직하지 않은 과도하거나 비정상적인 세포의 원치 않는 또는 제어되지 않는 세포 증식에 관한 것이다. 용어 "증식성 질환"은 대안적으로 "암"으로 지칭될 수 있다.

[0596] 적합한 증식성 질환(예를 들어, 암)은 바람직하게는 B7-H4를 발현하는 암성 세포의 존재를 특징으로 할 것이다.

[0597] 증식성 병태의 예는 신생물 및 종양(예를 들어, 조직구종, 신경아교종, 성상세포종, 골종), 암(예를 들어, 폐암, 소세포 폐암, 위장암, 장암, 결장암, 유방 암종, 난소 암종, 전립선암, 고환암, 간암, 신장암, 방광암, 췌장암, 뇌암, 육종, 골육종, 카포시 육종, 흑색종), 백혈병, 건선, 골 질환, (예를 들어, 결합 조직의)섬유증 증식성 장애, 및 아테롬성 동맥 경화증을 포함하는(이에 제한되지 않음) 양성, 전악성, 및 악성 세포 증식을 포함한다. 관심 대상의 다른 암은 혈액암; 악성종양 예컨대 백혈병 및 림프종, 예컨대 비호지킨 림프종, 및 하위유형 예컨대 DLBCL, 변연부, 외투세포, 및 여포성, 호지킨 림프종, AML, 및 B 또는 T 세포 기원의 다른 암을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 폐, 위장(예를 들어, 장, 결장을 포함), 유방(유방 관련), 난소, 전립선, 간(간 관련), 신장(신장 관련), 방광, 췌장, 뇌, 및 피부를 포함하나 이에 한정되지 않는 모든 유형의 세포가 치료될 수 있다.

[0598] 항체-약물 접합체는 예를 들어 세포 결합(시험관 내 또는 생체 내)의 검출을 돕기 위해 표지될 수 있다. 표지는 비오틴 표지일 수 있다. 다른 실시 형태에서, 표지는 방사성 동위원소일 수 있다.

[0599] 또 다른 양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다.

[0600] 일 실시 형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 단리된 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

[0601] 본 발명의 서열(들)(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 서열(들))은 자연 발생 환경으로부터 제거된 서열, 재조합 또는 클로닝된(예를 들어, DNA) 단리물 및 화학적으로 합성된 유사체 또는 이중 시스템에 의해 생물학적으로 합성된 유사체를 포함한다.

[0602] 본 발명의 서열(들)(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 서열(들))은 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 적합한 숙주 세포에서 복제 및/또는 발현에 의해 다량의 서열(들)이 생성될 수 있다. 원하는 단편을 암호화하는 천연 또는 합성 DNA 단편은 일반적으로 원핵 또는 진핵 세포로 도입하고 원핵 및 진핵 세포에서 복제할 수 있는 재조합 핵산 구축물, 일반적으로 DNA 구축물에 통합될 것이다. 일반적으로 DNA 구축물은 효모 또는 박테리아와 같은 단세포 숙주에서 자율 복제에 적합할 것이지만, 배양된 박테리아, 곤충, 포유류, 식물 또는 기타 진핵 세포주의 계놈으로의 도입 및 이러한 계놈 내에서 통합하기 위한 것일 수도 있다.

[0603] 본 발명의 서열(들)(예를 들어 폴리뉴클레오타이드 서열(들))은 또한 화학적 합성에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드가 포스포르아미다이트 방법 또는 트리-에스테르 방법에 의해 생성될 수 있고, 상업적인 자동화 올리고뉴클레오타이드 합성기에서 수행될 수 있다. 이중 가닥(예를 들어, DNA) 단편은 상보 가닥을 합성하고 적절한 조건에서 가닥을 함께 어닐링하여, 또는 적절한 프라이머 서열과 함께 DNA 폴리머라제를 사용하여 상보 가닥을 첨가하여, 화학적 합성의 단일 가닥 생성물로부터 얻을 수 있다.

[0604] 본 발명의 서열(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 서열)에 적용될 때, 용어 "단리된"은 바람직하게는 서열이 이의 천연 유전적 환경으로부터 제거되었고 따라서 다른 외래의 또는 원치 않는 암호화 서열이 없으며(그러나 자연

발생 5' 및 3' 비번역 영역, 예컨대, 프로모터 및 터미네이터를 포함할 수 있음), 유전자 조작된 단백질 생산 시스템 내에서 사용하기에 적합한 형태임을 나타낸다. 이러한 단리된 분자는 자연 환경으로부터 분리된 분자이다.

- [0605] 본원에서 제공되는 또 다른 양태는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포이며, 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.
- [0606] 일 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 VH 사슬을 암호화한다. 일 실시 형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 VL 사슬을 암호화할 수 있다. 일 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 VH 및 VL 사슬을 암호화할 수 있다. 일 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드는 리더 서열(예를 들어, 세포로부터 폴리펩티드의 수송을 제어하기 위한 분비 서열로서 기능함)을 추가로 암호화할 수 있다.
- [0607] 또 다른 양태에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터(예를 들어, 플라스미드)가 제공된다.
- [0608] 전술한 폴리뉴클레오티드의 변이체는 본 발명에 포함된다. 폴리뉴클레오티드 변이체는 암호화 영역, 비 암호화 영역 또는 둘 다에서 변형을 함유할 수 있다. 일 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드 변이체는 침묵 치환, 추가, 또는 결실을 생성하나 암호화된 폴리펩티드의 성질 또는 활성을 바꾸지 않는 변형을 포함한다. 일 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드 변이체는 유전 코드의 축퇴성으로 인한 침묵 치환에 의해 생성된다. 폴리뉴클레오티드 변이체는 다양한 이유들로, 예컨대, 특정 숙주를 위한 코돈 발현을 최적화하기 위해 (인간 mRNA 내의 코돈을 대장균과 같은 세균 숙주에 의해 선호되는 코돈으로 바꾸기 위해) 생성될 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 세포도 제공된다.
- [0609] 본 발명은 B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법을 포함하며, 방법은 숙주 세포에서 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계를 포함하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.
- [0610] 본 발명은 B7-H4 폴리펩티드(예를 들어, B7-H4 폴리펩티드 에피토프)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 상기 방법에 의해 수득 가능한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 추가로 포함한다.
- [0611] 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법은 (a) 숙주 세포를 배양하는 단계 및 (b) 세포로부터 발현된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 단리하는 단계를 포함한다.
- [0612] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현에 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효모, 곤충 또는 고등 진핵 세포를 포함한다(바람직하게는 폴리뉴클레오티드는 적절한 프로모터의 제어 하에 있다). 원핵 생물은 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어 *E. 콜라이(coli)* 또는 바실러스를 포함한다. 고등 진핵세포는 본원에 기재된 포유동물 기원의 확립된 세포주를 포함한다. 세포 무함유 번역 시스템도 사용될 수 있다.
- [0613] 일 양태에서, 본원에 기재된 항원 또는 항체 결합 단편을 포함하는 키트가 제공된다. 본 발명의 방법에서 상기 키트의 사용이 추가로 포함된다.
- [0614] 일 실시 형태에서, 키트는 본 발명의 단리된(예를 들어, 정제된) 항원 또는 항체 결합 단편을 포함한다. 일 실시 형태에서, 키트는 본 발명의 단리된(예를 들어, 정제된) 항원 또는 항체 결합 단편을 포함하고, 항원 또는 항체 결합 단편은 본원에 기재된 작용제(예를 들어 접합된 세포독소)를 포함한다. 일 실시 형태에서, 키트는 하나 이상의 용기를 포함한다. 키트는 항원 또는 항체 결합 단편 및 작용제를 개별적으로 제공할 수 있고(예를 들어, 작용제는 항원 또는 항체 결합 단편에 접합되지 않지만, 이에 대한 접합에 적합한 형태임); 선택적으로 키트에는 작용제를 항원 또는 항체 결합 단편에 접합시키기 위한 지침서 및/또는 시약이 추가로 제공된다. 일 실시 형태에서, 키트는 모든 대조군들, 분석을 수행하기 위한 설명서 및 결과의 분석 및 제시를 위한 임의의 필요한 소프트웨어를 비롯한, 검출 분석을 수행하는 데에 필요하고/하거나 충분한 모든 구성요소들을 포함한다.
- [0615] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 면역특이적 결합에 대한 분석법에 사용될 수 있다. 이용할 수 있는 면역분석법은 웨스턴 블롯, RIA, ELISA, ELISPOT, "샌드위치" 면역분석법, 면역침전 분석법, 침전소 반응법, 겔 확산 침전소 반응, 면역확산 분석법, 응집 분석법, 보체-고정 분석법, 면역방사측정 분석법, 형광 면역분석법 및 단백질 A 면역분석법과 같은 기법들을 이용하는 경쟁적 분석 시스템 및 비 경쟁적 분석 시스템을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0616] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 예를 들어, B7-H4 또는 이의 보존된 변이체 또는 펩티드 단편의 제자리(in situ) 검출을 위해, 면역형광, 면역전자 현미경관찰 또는 비 면역학적 분석법에서와 같이, 조직학적인

로 이용될 수 있다. 제자리 검출은 환자로부터 조직학적 표본을 떼어내어, 표지된 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 이러한 표본에 적용함으로써, 예컨대, 표지된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생물학적 샘플 위에 올려놓아 적용함으로써 달성될 수 있다. 이러한 절차의 이용을 통해 B7-H4, 또는 보존된 변이체 또는 펩티드 단편의 존재뿐만 아니라 검사된 조직에서의 이의 분포도 결정할 수 있다. 당업자라면 본 발명을 이용하여 이러한 제자리 검출을 달성하기 위해 매우 다양한 조직학적 방법들 중 임의의 조직학적 방법(예컨대, 염색 절차)을 변경시킬 수 있음을 용이하게 인식할 것이다.

[0617] 항체

[0618] 용어 "항체"는 단클론 항체 및 이의 단편(예를 들어 원하는 생물학적 활성을 나타냄)을 포함한다. 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 항체는 단클론 항체이다. 더욱 바람직한 실시 형태에서, 항체는 완전 인간 단클론 항체이다. 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 다클론 항체를 사용할 수 있다.

[0619] 특히, 항체는 적어도 1개 또는 2개의 중쇄(H) 가변 영역(본원에서는 VHC로 약칭함) 및 적어도 1개 또는 2개의 경쇄(L) 가변 영역(본원에서는 VLC로 약칭함)을 포함하는 단백질이다. VHC 및 VLC 영역은 "프레임워크 영역"(FR)으로 지칭되는 더욱 보존된 영역이 산재된 "상보성 결정 영역"("CDR")으로 지칭되는 초가변성의 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 프레임워크 영역 및 CDR의 범위는 정확하게 정의되었다(문헌[Kabat, E.A., et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991] 및 문헌[Chothia, C. et al, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987] 참조). 바람직하게는, 각 VHC 및 VLC는 아미노-말단에서 카르복시-말단으로, 하기의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어져 있다: FR1, CDR1, FR2, DR2, FR3, CDR3, FR4. 항체의 VHC 또는 VLC 사슬은 추가로 중쇄 또는 경쇄 불변 영역의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 항체는 2개의 중쇄 면역글로불린 사슬 및 2개의 경쇄 면역글로불린 사슬의 사량체이고, 여기서 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 사슬은 예를 들어 이황화 결합에 의해 상호연결된다. 중쇄 불변 영역은 세 개의 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 구성된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 용어 "항체"는 유형 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM(뿐만 아니라 이들의 하위 유형)의 온전한 면역글로불린을 포함하며, 여기서 면역글로불린의 경쇄는 카파 또는 람다 유형일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 항체는 또한 상기 언급된 마커 중 하나에 결합하는 항체의 일부, 예를 들어 하나 이상의 면역글로불린 사슬이 전체 길이는 아니지만 마커에 결합하는 분자를 지칭한다. 용어 항체 내에 포함되는 결합 부분의 예는 (i) VLC, VHC, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VHC 및 CH1 도메인으로 구성된 Fc 단편; (iv) 항체의 단일 암(arm)의 VLC 및 VHC 도메인으로 구성된 Fv 단편, (v) VHC 도메인으로 구성된 dAb 단편(Ward et al, Nature 341:544-546, 1989); 및 (vi) 결합하기에 충분한 프레임워크를 갖는 단리된 상보성 결정 영역(CDR), 예를 들어, 가변 영역의 항원 결합 부분을 포함한다. 경쇄 가변 영역의 항원 결합 부분과 중쇄 가변 영역의 항원 결합 부분, 예를 들어, Fv 단편의 두 도메인, VLC 및 VHC는 이들을 VLC 및 VHC 영역이 쌍을 이루어 1가 분자(단일 사슬 Fv(scFv)로 알려짐)를 형성하는 단일 단백질 사슬로 만들어지게 하는 합성 링커에 의해 재조합 방법을 사용하여 연결될 수 있다(예를 들어, 문헌[Bird et al. (1988) Science 1A1-ATi-A1β]; 및 문헌[Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883] 참조). 이러한 단일 사슬 항체 또한 용어 항체에 포함된다. 이들은 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 사용하여 수득될 수 있고, 부분은 온전한 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대하여 스크리닝된다.

[0620] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 무린 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단클론 항체, 다클론 항체, 재조합 항체, 다중특이적 항체, 또는 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상이다.

[0621] 일 실시 형태에서, 항원 결합 단편은 Fv 단편, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fab' 단편, dsFv 단편, scFv 단편, sc(Fv)₂ 단편, 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 하나 이상이다.

[0622] 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단클론 항체(mAb)이다.

[0623] 일 실시 형태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어 mAb)은 scFV이다.

[0624] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 종을 가로질러 B7-H4 분자에 결합할 수 있고, 예를 들어 항체 또는 단편은 마우스 B7-H4, 랫트 B7-H4, 토끼, 인간 B7-H4 및/또는 시노물구스 원숭이 B7-H4에 결합할 수 있다. 일 실시 형태에서, 항체 또는 단편은 인간 B7-H4 및 시노물구스 원숭이 B7-H4에 결합할 수 있다. 일 실시 형태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 또한 마우스 B7-H4에 결합할 수 있다.

- [0625] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 B7-H4, 예를 들어 인간 B7-H4 및 시노물구스 원숭이 B7-H4에 특이적으로 결합할 수 있지만, 인간 B7-H1, B7-H2 및/또는 B7-H3에 특이적으로 결합하지 않는다.
- [0626] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 VH 및 VL 이외에도, 중쇄 불변 영역 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 중쇄 불변 영역은 인간 중쇄 불변 영역, 예를 들어 인간 IgG 불변 영역, 예를 들어 인간 IgG1 불변 영역이다. 일부 실시 형태(바람직하게는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 작용제, 예컨대, 세포독성제에 접합되는 경우)에서, 시스테인 잔기는 IgG1의 CH2 영역의 아미노산 S239와 V240 사이에 삽입된다. 이 시스테인은 "239 삽입" 또는 "239i"라 지칭된다.
- [0627] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함할 수 있다.
- [0628] 일 실시 형태에서, 중쇄 불변 영역 또는 이의 단편, 예를 들어, 인간 IgG 불변 영역 또는 이의 단편은 야생형 IgG 불변 도메인과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있으며, 여기서, 변형된 IgG는 야생형 IgG 불변 도메인을 갖는 IgG의 반감기와 비교하여 증가된 반감기를 갖는다. 예를 들어, IgG 불변 도메인은 251~257, 285~290, 308~314, 385~389 및 428~436 위치의 아미노산 잔기의 하나 이상의 아미노산 치환을 함유할 수 있는데, 이때, 이러한 아미노산 위치 넘버링은 카밧에 기재된 EU 인덱스에 따른 것이다. 일 실시 형태에서 IgG 불변 도메인은 카밧 위치 252의 아미노산의 티로신(Y), 페닐알라닌(F), 트립토판(W), 또는 트레오닌(T)으로의 치환, 카밧 위치 254의 아미노산의 트레오닌(T)으로의 치환, 카밧 위치 256의 아미노산의 세린(S), 아르기닌(R), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 또는 트레오닌(T)으로의 치환, 카밧 위치 257의 아미노산의 류신(L)으로의 치환, 카밧 위치 309의 아미노산의 프롤린(P)으로의 치환, 카밧 위치 311의 아미노산의 세린(S)으로의 치환, 카밧 위치 428의 아미노산의 트레오닌(T), 류신(L), 페닐알라닌(F), 또는 세린(S)으로의 치환, 카밧 위치 433의 아미노산의 아르기닌(R), 세린(S), 이소류신(I), 프롤린(P), 또는 글루타민(Q)으로의 치환, 또는 카밧 위치 434의 아미노산의 트립토판(W), 메티오닌(M), 세린(S), 히스티딘(H), 페닐알라닌(F), 또는 티로신으로의 치환 중 하나 이상을 함유할 수 있다. 바람직한 실시 형태에서, IgG 불변 도메인은 카밧 위치 252의 아미노산의 티로신(Y)으로의 치환, 카밧 위치 254의 아미노산의 트레오닌(T)으로의 치환 및 카밧 위치 256의 아미노산의 글루탐산(E)으로의 치환을 포함하는, 야생형 인간 IgG 불변 도메인에 대한 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄를 포함하고, 중쇄는 인간 IgG1 YTE 돌연변이체이다.
- [0629] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 VH 및 VL 이외에도, 선택적으로 중쇄 불변 영역 또는 이의 단편, 경쇄 불변 영역 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 경쇄 불변 영역은 카파 람다 경쇄 불변 영역, 예를 들어, 인간 카파 불변 영역 또는 인간 람다 불변 영역이다.
- [0630] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0631] 일 실시 형태에서, VH 및/또는 VL 아미노산 서열은 본원에 제시된 서열과 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 유사성을 가질 수 있다. 일 실시 형태에서, VH 및/또는 VL 아미노산 서열은 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 치환, 예를 들어 본원에 제시된 서열에 비해 보존적 치환을 포함할 수 있다. VH 영역 또는 VL 영역에 대해 특정 퍼센트 유사성을 나타내거나, 하나 이상의 치환, 예컨대, 보존적 치환을 갖는 VH 및 VL 영역을 갖는 B7-H4 항체는 본원에 기재된 VH 및/또는 VL 영역을 암호화하는 핵산 분자들의 돌연변이 유발(예컨대, 부위 특이적 또는 PCR 매개성 돌연변이 유발)에 이어, 암호화된 변경된 항체의 B7-H4에 대한 결합 시험 및 선택적으로 본원에 기재된 기능적 분석법을 이용한 보유된 기능 시험에 의해 획득될 수 있다.
- [0632] 항원에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 친화도 또는 결합력은 당해 분야에 잘 알려져 있는 임의의 적절한 방법, 예컨대, 유동 세포분석법, 효소결합 면역흡착 측정법(ELISA) 또는 방사성면역분석법(RIA), 또는 동역학(예컨대, KINEXA® 또는 BIACORE™ 분석)을 이용하여 실험적으로 결정할 수 있다. 직접적인 결합 분석법뿐만 아니라, 경쟁적 결합 분석법 포맷이 용이하게 활용될 수 있다. (예를 들어, 문헌[Berzofsky et al., Antibody-Antigen Interactions, In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984)]; 문헌[Kuby, Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992)]; 및 본원에 기재된 방법 참조.) 측정된 특정 항체-항원 상호작용의 친화도는 상이한 조건(예컨대, 염 농도, pH, 온도) 하에서 측정되었다면 다를 수 있다. 따라서, 친화도 및 기타 항원 결합 파라미터(예컨대, KD 또는 Kd, Kon, Koff)의 측정은

당업계에 공지된 바와 같이, 표준화된 항체 및 항원 용액, 그리고 표준화된 완충액을 이용하여 이루어진다.

- [0633] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 약 500 nM 미만, 약 350 nM 미만, 약 250 nM 미만, 약 150 nM 미만, 약 100 nM 미만, 약 75 nM 미만, 약 60 nM 미만, 약 50 nM 미만, 약 40 nM 미만, 약 30 nM 미만, 약 20 nM 미만, 약 15 nM 미만, 약 10 nM 미만, 약 5 nM 미만, 약 1 nM 미만, 약 500 pM 미만, 약 350 pM 미만, 약 250 pM 미만, 약 150 pM 미만, 약 100 pM 미만, 약 75 pM 미만, 약 60 pM 미만, 약 50 pM 미만, 약 40 pM 미만, 약 30 pM 미만, 약 20 pM 미만, 약 15 pM 미만, 약 10 pM 미만, 또는 약 5 pM 미만의 IC₅₀으로 B7-H4 발현 세포에 결합할 수 있다. 바람직하게는, 상기 IC₅₀은 유동 세포분석법에 의해 측정된다.
- [0634] "단클론 항체"(mAb)는 단일 항원 결정기 또는 에피토프의 고도로 특이적인 인식 및 결합에 관여하는 동종 항체 집단을 지칭한다. 이는 전형적으로 상이한 항원 결정기들에 대한 상이한 항체들을 포함하는 다클론 항체와 대조된다. 용어 "단클론 항체"는 온전한 단클론 항체와 전장 단클론 항체 둘 모두와, 항체 단편(예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단쇄(scFv) 돌연변이체, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 기타 변형된 면역글로불린 분자를 포함한다. 나아가, "단클론 항체"는 하이브리도마, 파지 선택, 재조합 발현 및 형질전환 동물을 포함하나 이에 한정되지 않는, 임의의 여러 방식으로 제조된 이러한 항체를 지칭한다.
- [0635] 바람직한 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, mAb)은 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 적합하게는, 상기 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG이다.
- [0636] 용어 "인간화 항체"는 최소의 비 인간(예를 들어, 무린) 서열을 함유하도록 조작된 비 인간(예를 들어, 무린) 면역글로불린으로부터 유래된 항체를 나타낸다. 전형적으로, 인간화 항체는, CDR(상보적 결정 영역)로부터의 잔기들이 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비 인간 중(예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼, 또는 햄스터)의 CDR로부터의 잔기들로 대체된 인간 면역글로불린이다(Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeven et al., 1988, Science, 239:1534-1536). 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FW) 잔기는 원하는 특이성, 친화도, 및 능력을 갖는 비 인간 중으로부터의 항체 내 상응하는 잔기로 대체된다.
- [0637] 인간화 항체는 Fv 프레임워크 영역에서 및/또는 대체된 비 인간 잔기 내에서 추가적인 잔기들의 치환에 의해 추가 변형되어 항체 특이성, 친화도 및/또는 능력을 개선하고 최적화할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비 인간 면역글로불린에 상응하는 CDR 영역을 모두, 또는 실질적으로 모두 함유하는, 적어도 하나의, 그리고 전형적으로 2개 또는 3개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것인 반면, FR 영역의 전부, 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 공통 서열의 것이다. 인간화 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 인간화 항체를 생성하는 데 사용되는 방법의 예는 미국 특허 제5,225,539호 또는 제5,639,641호에 기재되어 있다.
- [0638] 항체의 "가변 영역"은 단독으로 또는 조합하여 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역을 나타낸다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각이 초가변 영역으로도 알려진 3개의 상보적 결정 영역(CDR)에 의해 연결된 4개의 프레임워크 영역(FW)으로 구성된다. 각각의 쇠에서의 CDR들은 FW 영역에 의해 서로 매우 가까이 유지되고, 다른 쇠의 CDR들과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다. CDR을 결정하기 위한 적어도 2개의 기술이 있다: (1) 교차-중 서열 가변성에 기초한 접근법(즉, Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구에 기초한 접근법(Al-lazikani et al. (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). 또한, 이들 두 접근법의 조합이 당해 분야에서 CDR을 결정하는 데 사용되기도 한다.
- [0639] "카밧 넘버링 시스템"은 일반적으로 가변 도메인 내의 잔기(대략적으로 경쇄의 잔기 1 내지 107 및 중쇄의 잔기 1 내지 113)를 지칭할 때 사용된다(예컨대, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).
- [0640] 카밧에서와 같은 아미노산 위치 넘버링은 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)에서 항체들의 편집물의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대하여 사용된 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 이용하면, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 단축 또는 가변 도메인의 FW 또는 CDR 내로의 삽입에 상응하는 더 적은 아미노산 또는 추가적인 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들면, 중쇄 가변성 도메인은 단일 아미노산 삽입부(카밧에 따른 잔기 52a)를 H2의 잔기 52 뒤에 포함하고, 삽입된 잔기(예를 들어, 카밧에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 중쇄 FW 잔기 82 뒤에 포함할 수 있다.

[0641] 잔기의 카뱃 넘버링은 주어진 항체에 대해 항체 서열의 상동성 영역에서 "표준적인" 카뱃 넘버링된 서열과 정렬 시킴으로써 결정할 수 있다. 코티아는 대신에 구조적 루프의 위치를 지칭한다(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). 카뱃 넘버링 관례를 이용하여 넘버링했을 때 코티아 CDRH1의 말단은 루프의 길이에 따라 H32와 H34 사이에서 다르다(이는 카뱃 넘버링 체계가 H35A와 H35B에 삽입물을 위치시키기 때문이다; 만일 35A와 35B가 존재하지 않는다면, 이러한 루프는 32에서 끝난다; 35A만 존재한다면, 이러한 루프는 33에서 끝난다; 35A와 35B 모두가 존재할 경우, 이러한 루프는 34에서 끝난다). AbM 초가변 영역은 카뱃 CDR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충을 나타내며, Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. 아래 표는 각 시스템에서 항체의 가변 영역을 포함하는 아미노산의 위치를 나열한 것이다.

영역	카뱃	AbM	코티아
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
HCDR1 ¹	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32, 34
HCDR1 ²	H31-H35	H26-H35	H26-H32
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0642]

[0643] ¹ 카뱃 넘버링

[0644] ² 코티아 넘버링

[0645] IMGT(ImMunoGeneTics)도 CDR들을 포함하는 면역글로불린 가변 영역에 대한 넘버링 시스템을 제공한다. 예를 들어, 문헌[Lefranc, M.P. et al., Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77(2003)] 참조. IMGT 넘버링 시스템은 5,000개를 초과하는 서열들의 정렬, 구조적 데이터 및 초가변 루프의 특성화를 기초로 하고, 모든 종들에 대한 가변 영역 및 CDR 영역의 용이한 비교를 가능하게 한다. IMGT 넘버링 체계에 따르면, VH-CDR1은 위치 26 내지 35에 존재하고, VH-CDR2는 위치 51 내지 57에 존재하고, VH-CDR3은 위치 93 내지 102에 존재하고, VL-CDR1은 위치 27 내지 32에 존재하고, VL-CDR2는 위치 50 내지 52에 존재하고, VL-CDR3은 위치 89 내지 97에 존재한다.

[0646] 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같이, 기재된 VH CDR 서열들은 전통적인 카뱃 넘버링 위치에 해당한다. 즉, 카뱃 VH-CDR1은 위치 31 내지 35에 존재하고, VH-CDR2는 위치 50 내지 65에 존재하고, VH-CDR3은 위치 95 내지 102에 존재한다. VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3도 전통적인 카뱃 넘버링 위치, 즉, 각각 위치 24 내지 34, 50 내지 56 및 89 내지 97에 해당한다.

[0647] 일 실시 형태에서, 본 발명의 항체는 인간 항체이다.

[0648] 용어 "인간 항체"는 인간에서 생성된 항체, 또는 당해 분야에서 공지된 임의의 기법을 이용함으로써 제조된, 인간에서 생성된 항체에 상응하는 아미노산 서열을 가진 항체를 의미한다. 인간 항체의 이 정의는 온전한 또는 전장 항체, 이의 단편, 및/또는 적어도 하나의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체, 예를 들면, 무린 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체를 포함한다.

[0649] 일 실시 형태에서, 본 발명의 항체는 키메라 항체이다.

[0650] 용어 "키메라 항체"는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열이 2 이상의 종들로부터 유래된 항체를 지칭한다. 전형적으로, 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 가변 영역은 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 포유동물의 한 종(예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼 등)으로부터 유래된 항체의 가변 영역에 해당하되, 불변 영역은 그 종에서 면역 반응을 유도하는 것을 막기 위해 또 다른 종(통상적으로 인간)으로부터 유래된 항체의 서열에 상응한다.

[0651] 용어 "YTE" 또는 "YTE 돌연변이체"는 IgG1 Fc에서의 돌연변이를 나타내는데, 이는 그 돌연변이를 갖는 항체의 혈청 반감기를 개선하고 인간 FcRn에의 결합을 증가시킨다. YTE 돌연변이체는 IgG1의 중쇄 내로 도입된 3개의 돌연변이 M252Y/S254T/T256E(EU 넘버링 Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, D.C.)의 조합을 포함한다. 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제7,658,921호 참조. 이러한 YTE 돌연변이체는 동일한 항체의 야생형 버전과 비교하여 항체의 혈청 반감기를 대략 4배 증가시키는 것으로 밝혀졌다(Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006); Robbie et al., (2013) Antimicrob. Agents Chemother. 57, 6147-6153). 또한, 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제7,083,784호 참조.

- [0652] "결합 친화도"는 일반적으로 분자(예를 들면, 항체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 파트너(예를 들면, 항원) 사이의 비 공유적 상호작용의 총 합계의 강도를 지칭한다. 달리 표시되지 않으면, 본원에서 사용되는 바와 같이, "결합 친화도"는 결합하는 쌍(예를 들어, 항체와 항원)의 멤버들 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 나타낸다. 분자 X의 상대 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수(KD)로 나타낼 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 방법들을 포함하는, 당해 분야에 공지된 통상의 방법들에 의해 측정할 수 있다. 저-친화도 항체는 일반적으로 항원에 천천히 결합하며, 쉽게 해리되는 경향이 있는 반면, 고-친화도 항체는 일반적으로 항원에 더 빨리 결합하고 더 오래 결합하여 있는 경향이 있다. 다양한 결합 친화도 측정 방법들이 당해 분야에 공지되어 있고, 이 방법들 중 임의의 방법을 본 발명의 목적을 위해 이용할 수 있다.
- [0653] 달리 언급되어 있지 않은 한, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 "효능"은 통상적으로 ng/ml로 나타낸 IC50 값으로서 표현된다. IC50은 항체 분자의 중간 억제 농도이다. 기능성 분석에서, IC50은 최대치의 50%까지 생물학적 반응을 감소시키는 농도이다. 리간드 결합 연구에서, IC50은 최대 특이적 결합 수준의 50%까지 수용체 결합을 감소시키는 농도이다. IC50은 당해 분야에 공지된 다수의 수단에 의해 계산할 수 있다.
- [0654] 기준 항체와 비교하여 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 대한 효능의 배수 개선은 적어도 약 2배, 적어도 약 4배, 적어도 약 6배, 적어도 약 8배, 적어도 약 10배, 적어도 약 20배, 적어도 약 30배, 적어도 약 40배, 적어도 약 50배, 적어도 약 60배, 적어도 약 70배, 적어도 약 80배, 적어도 약 90배, 적어도 약 100배, 적어도 약 110배, 적어도 약 120배, 적어도 약 130배, 적어도 약 140배, 적어도 약 150배, 적어도 약 160배, 적어도 약 170배 또는 적어도 약 180배 이상일 수 있다.
- [0655] 항체의 결합 효능은 달리 언급되지 않는 한 일반적으로 EC50 값(nM 또는 pM)으로 표현된다. EC50은 소정의 노출 시간 후 기준선과 최대값 사이의 중간 반응을 유도하는 약물의 농도이다. EC50은 당해 분야에 공지된 다수의 수단에 의해 계산할 수 있다.
- [0656] 항체 제조
- [0657] 본 발명의 항체는 당업자에게 공지된 통상적인 기술 및 통상적인 결합 연구에 의해 확인된 이의 유용성을 사용하여 수득될 수 있다(예시적인 방법은 실시예 2에 기재되어 있다). 예로서, 단순 결합 분석은 항원 발현 세포를 항체와 함께 인큐베이션하는 것이다. 항체가 형광단으로 태그 부착된 경우, 항원에 대한 항체의 결합은 FACS 분석에 의해 검출할 수 있다.
- [0658] 본 발명의 항체는 마우스, 랫트, 토끼, 염소, 양, 원숭이 또는 말을 비롯한 다양한 동물에서 생성될 수 있다. 항체는 개별 험막 다당류 또는 복수의 험막 다당류로 면역화한 후 생성될 수 있다. 이 동물로부터 단리된 혈액은 동일 항원에 결합하는 다중 항체인 다클론 항체를 포함한다. 또한 난황에서의 다클론 항체의 생성을 위해 항원을 닭에 주입할 수 있다. 항원의 단일 에피토프에 특이적인 단클론 항체를 얻기 위해, 항체-분비 림프구를 동물로부터 단리하고 상기 림프구와 암 세포주의 융합에 의해 불멸화한다. 융합된 세포는 하이브리도마로 지칭되며, 배양에서 지속적으로 성장하고 항체를 분비한다. 단일 하이브리도마 세포를 희석 클로닝에 의해 단리하여 동일한 항체를 모두가 생산하는 세포 클론을 생성하며; 이러한 항체는 단클론 항체로 칭해진다. 단클론 항체를 생성하는 방법은 당업자에게 공지된 통상적인 기술이다(예를 들어, 문헌[Making and Using Antibodies: A Practical Handbook, GC Howard, CRC Books, 2006, ISBN 0849335280] 참조). 다클론 및 단클론 항체는 종종 단백질 A/G 또는 항원 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제된다.
- [0659] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 문헌[Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975)]에 기재된 것과 같은 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있는 단클론 항-B7-H4 항체로서 제조될 수 있다. 이러한 하이브리도마 방법을 이용하여 마우스, 햄스터 또는 기타 적절한 숙주 동물을 위에 기재된 바와 같이 면역화시켜 면역화 항원에 특이적으로 결합할 항체의 림프구에 의한 생성을 유발한다. 림프구는 시험관 내에서 면역화될 수도 있다. 면역화 후, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 림프구를 단리하고 적합한 골수종 세포주와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한 후, 이 하이브리도마 세포를 융합되지 않은 림프구 및 골수종 세포로부터 선별할 수 있다. 그 다음, 면역침전, 면역블롯팅 또는 시험관 내 결합 분석법, 예를 들면, 방사성면역분석법(RIA) 또는 효소결합 면역흡착 분석법(ELISA)으로 결정된 바에 따라, 선택된 항원에 대해 특이적으로 유도된 단클론 항체를 생성하는 하이브리도마를, 표준 방법(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986)을 이용하여 시험관 내 배양물에서 증식시킬 수 있거나 동물에서 복수 종양으로서 생체 내에서 증식시킬 수 있다. 그 후, 공지된 방법을 이용하여 배양 배지 또는 복수액으로부터 단클론 항체를 정제할 수 있다.

- [0660] 대안적으로, 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 단클론 항체로서)은 또한 미국 특허 제4,816,567호에 기재된 바와 같은 재조합 DNA 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 단클론 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 예컨대, 이러한 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자를 특이적으로 증폭시키는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용한 RT-PCR에 의해 성숙한 B 세포 또는 하이브리도마 세포로부터 단리되고, 이의 서열은 통상적인 절차를 이용하여 결정된다. 그 후, 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드는 적합한 발현 벡터 내로 클로닝되며, 이것으로 E. 콜라이 세포, 유인원 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 면역글로불린 단백질질을 달리 생성하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포를 형질감염시키는 경우 단클론 항체가 숙주 세포에 의해 생성된다. 또한, 원하는 종의 재조합 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 문헌[McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]; 및 문헌[Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이 원하는 종의 CDR들을 발현하는 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리될 수 있다.
- [0661] 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 이러한 폴리뉴클레오타이드(들)를 재조합 DNA 기술을 이용하여 다수의 상이한 방식으로 더 변형시켜 대안적인 항체들을 생성할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 예를 들어, 마우스 단클론 항체의 경쇄 및 중쇄의 불변 도메인들은 (1) 키메라 항체를 생성하기 위해 예를 들어 인간 항체의 이들 영역들 대신에 치환될 수 있거나, (2) 융합 항체를 생성하기 위해 비 면역글로불린 폴리펩티드 대신에 치환될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이러한 불변 영역들은 단클론 항체의 원하는 항체 단편을 생성하기 위해 절두되거나 제거된다. 가변 영역의 부위 특이적 또는 고밀도 돌연변이 유발이 단클론 항체의 특이성, 친화도 등을 최적화하는 데 이용될 수 있다.
- [0662] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 인간 항체는 당 업계에 공지된 다양한 기술들을 이용하여 직접적으로 제조될 수 있다. 표적 항원에 대해 유도된 항체를 생성하는, 시험관 내에서 면역화되었거나 면역화된 개체로부터 단리된 불멸화된 인간 B 림프구가 생성될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)]; 문헌[Boemer et al., J. Immunol. 147 (1):86-95 (1991)]; 미국 특허 제5,750,373호 참조.
- [0663] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 예를 들어 문헌[Vaughan et al., Nat. Biotech. 14:309-314 (1996)]; 문헌[Sheets et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:6157-6162 (1998)]; 문헌[Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991)]; 및 문헌[Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581 (1991)]에 기재된 바와 같이, 파지 라이브러리로부터 선택될 수 있으며, 여기서 이 파지 라이브러리는 인간 항체를 발현한다. 항체 파지 라이브러리의 생성 및 사용 기술은 또한 미국 특허 제5,969,108호, 제6,172,197호, 제5,885,793호, 제6,521,404호; 제6,544,731호; 제6,555,313호; 제6,582,915호; 제6,593,081호; 제6,300,064호; 제6,653,068호; 제6,706,484호; 및 제7,264,963호; 및 문헌[Rothe et al., J. Molec. Biol. 376:1182-1200 (2008)]에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로 포함된다.
- [0664] 친화도 성숙 전략 및 사슬 서플링 전략이 당 업계에 공지되어 있으며, 고친화도 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성하기 위하여 이용될 수 있다. 전체가 참조로 포함된 문헌[Marks et al., BioTechnology 10:779-783 (1992)] 참조.
- [0665] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 단클론 항체)은 인간화된 항체일 수 있다. 비 인간 또는 인간 항체를 조작하거나, 인간화하거나 재표면화하는(resurfacing) 방법이 또한 이용될 수 있고, 당 업계에 잘 공지되어 있다. 인간화, 재표면화 또는 유사하게 조작된 항체는 비 인간, 예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼, 비 인간 영장류 또는 기타 포유동물(그러나 이에 한정되지 않음)인 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이들 비 인간 아미노산 잔기는 전형적으로, 공지된 인간 서열의 "이입(import)" 가변, 불변 또는 기타 도메인으로부터 취한 "이입" 잔기라 종종 지칭되는 잔기들로 대체된다. 이러한 이입된 서열들은 당 업계에 공지되어 있는 바와 같이 면역원성을 감소시키거나, 결합성, 친화성, 결합 속도, 해리 속도, 결합력, 특이성, 반감기 또는 임의의 기타 적합한 특성을 감소시키거나, 향상시키거나 변경시키기 위하여 이용될 수 있다. 적합하게는, CDR 잔기는 B7-H4 결합에 영향을 주는 것에 직접적이면서 가장 실질적으로 관여할 수 있다. 따라서, 비 인간 또는 인간 CDR 서열의 일부 또는 전부는 유지되는 반면, 가변 및 불변 영역의 비 인간 서열은 인간 또는 기타 아미노산으로 대체될 수 있다.
- [0666] 또한, 항체는 B7-H4 항원에 대한 높은 친화도 및 기타 유리한 생물학적 성질을 보유하도록 선택적으로 인간화, 재표면화, 조작 또는 인간 항체 조작될 수 있다. 이 목표를 달성하기 위해, 인간화(또는 인간) 또는 조작된 항-B7-H4 항체 및 재표면화 항체는 모 서열, 조작된 서열 및 인간화 서열의 3차원적 모델을 이용하여 모 서열 및

다양한 개념적인 인간화 및 조작된 생성물들을 분석하는 과정에 의해 선택적으로 제조될 수 있다. 3차원적 면역글로불린 모델이 흔히 이용될 수 있고, 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원적 입체배와 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 이들 디스플레이의 검사는 후보 면역글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 면역글로불린이 이의 항원, 예컨대, B7-H4에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, FW 잔기가 원하는 항체 특성, 예컨대, 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도가 달성되도록 공통 서열 및 이입 서열들로부터 선택되어 조합될 수 있다.

[0667] 본 발명의 항-B7-H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 인간화, 재표면화 또는 조작은 문헌[Jones et al., Nature 321:522 (1986)]; 문헌[Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)]; 문헌[Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)]; 문헌[Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993)]; 문헌[Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987)]; 문헌[Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)]; 문헌[Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)]; 미국 특허 제5,639,641호, 제5,723,323호; 제5,976,862호; 제5,824,514호; 제5,817,483호; 제5,814,476호; 제5,763,192호; 제5,723,323호; 제5,766,886호; 제5,714,352호; 제6,204,023호; 제6,180,370호; 제5,693,762호; 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,225,539호; 제4,816,567호, 제7,557,189호; 제7,538,195호; 및 제7,342,110호; 국제 특허 출원 PCT/US98/16280; PCT/US96/18978; PCT/US91/09630; PCT/US91/05939; PCT/US94/01234; PCT/GB89/01334; PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; 국제 공개 WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; 및 유럽 특허 공보 EP 229246(이들 각각은 그 안에 인용된 참고 문헌을 포함하여 전체적으로 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 것과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 임의의 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다

[0668] 항-B7-H4 인간화 항체 및 이의 항원 결합 단편은 내인성 면역글로불린 생성 부재 하에서 면역조치 시 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생성할 수 있는 인간 면역글로불린좌를 함유하는 형질전환 마우스에서도 제조될 수 있다. 이 접근법은 미국 특허 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 및 제5,661,016호에 기재되어 있다.

[0669] 일 실시 형태에서, 항체(예를 들어, 항-B7-H4 항체)의 단편(예를 들어, 항체 단편)이 제공된다. 항체 단편 생성을 위한 다양한 기술들이 공지되어 있다. 전통적으로, 이들 단편은 예를 들어, 문헌[Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Meth. 24:107-117 (1993)] 및 문헌[Brennan et al., Science 229:81 (1985)]에 기재된 바와 같이, 온전한 항체의 단백질 용해성 분해를 통해 유래된다. 일 실시 형태에서, 항-B7-H4 항체 단편은 재조합적으로 생성된다. Fab, Fv, 및 scFv 항체 단편을 모두 E. 콜라이 또는 다른 숙주 세포에서 발현시키고 이로부터 분비시킴으로써 다량의 이러한 단편의 생성을 허용할 수 있다. 이러한 항-B7-H4 항체 단편은 위에서 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수도 있다. 이러한 항-B7-H4 항체 단편은 미국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같이 선택 항체일 수도 있다. 항체 단편의 기타 제조 기법은 당업자에게 자명할 것이다.

[0670] 본 발명에 따르면, B7-H4에 특이적인 단일쇄 항체의 생산 기법이 채택될 수 있다. (예컨대, 미국 특허 제4,946,778호 참조). 또한, B7-H4에 대한 원하는 특이성을 가진 단클론 Fab 단편, 또는 이의 유도체, 단편, 유사체 또는 상동체의 신속하고 효과적인 확인을 가능하게 하기 위해 Fab 발현 라이브러리를 구축하는 방법이 채택될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989)] 참조. 항체 단편은 또한 당업계에 공지된 기술에 의해 제조될 수 있으며, 이는 하기를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다: 항체 분자의 펩신 소화에 의해 생성된 F(ab')₂ 단편; F(ab')₂ 단편의 이황화 가교를 감소시킴으로써 생성된 Fab 단편; 항체 분자를 파파인 및 환원제로 처리하여 생성된 Fab 단편; 또는 Fv 단편.

[0671] 일 실시 형태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 이의 혈청 반감기를 증가시키기 위하여 변형될 수 있다. 이것은 예를 들면, 항체 또는 항체 단편의 적절한 영역의 돌연변이로 살비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체 또는 항체 단편 내로 도입하거나, (예를 들면, DNA 또는 펩티드 합성으로) 어느 한 말단 또는 중간에서 항체 또는 항체 단편에 융합되는 펩티드 태그 내로 에피토프를 도입함으로써, 또는 YTE 돌연변이에 의해 달성될 수 있다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 혈청 반감기를 증가시키는 기타 방법, 예를 들면, 이중분자, 예컨대, PEG와의 접합이 당해 분야에 공지되어 있다.

[0672] 본원에 제공된 바와 같은 변형 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 이러한 항체 또는 폴리펩티드의 B7-H4와의 회합을 제공하는 임의의 유형의 가변 영역을 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 이러한 가변 영역은 체액성 반응을 시작하고 원하는 항원에 대한 면역글로불린을 생성하도록 유도될 수 있는 임의의 유형의 포유동물을 포함하거나 이러한 포유동물로부터 유래될 수 있다. 따라서, 항-B7-H4 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 가변 영역은 예를

들어, 인간, 류린, 비 인간 영장류(예컨대, 시노몰구스 원숭이, 마카크 등) 또는 이리 기원의 것일 수 있다. 일 실시 형태에서, 변형 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 가변 및 불변 영역 둘 다가 인간이다. 일 실시 형태에서, (보통 비 인간 공급원으로부터 유래된) 양립가능 항체의 가변 영역은 조작되거나 특이적으로 맞추어져 이러한 분자의 면역원성을 감소시키거나 결합 특성을 개선할 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명에 유용한 가변 영역은 인간화되거나 그렇지 않으면 이입된 아미노산 서열의 포함을 통해 변경될 수 있다.

[0673] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 및 경쇄 둘 다의 가변 도메인들은 하나 이상의 CDR들의 적어도 부분적인 대체 및/또는 부분적인 프레임워크 영역 대체 및 서열 바꿈에 의해 변경된다. 이러한 CDR들이 프레임워크 영역이 유래되는 항체와 동일한 부류 또는 심지어 하위 부류의 항체로부터 유래될 수 있지만, 이러한 CDR들은 상이한 부류의 항체로부터, 그리고 특정 실시 형태에서는 상이한 종의 항체로부터 유래될 것임이 예상된다. 모든 CDR을 도너 가변 영역으로부터의 완전 CDR로 대체하여 하나의 가변 도메인의 항원 결합 능력을 또 다른 가변 도메인으로 옮기는 것은 필요하지 않다. 오히려, 항원 결합 부위의 활성을 유지하는 데 필요한 잔기를 옮기는 것만이 필요하다. 미국 특허 제5,585,089호, 제5,693,761호 및 제5,693,762호에 기재된 설명을 고려하면, 통상적인 실험을 수행하여 면역원성이 감소된 기능성 항체를 수득하는 것은 당업자의 능력 범위 내에 해당할 것이다.

[0674] 가변 영역에 대한 변경에도 불구하고, 당업자는 본 발명의 변형 항체 또는 이의 항원 결합 단편이, 불변 영역 도메인들 중 하나 이상의 적어도 일부분이 결실되었거나 그렇지 않으면 변경되어 원했던 생화학적 특성, 예컨대, 천연의 또는 변경되지 않은 불변 영역을 포함하는 대략 동일한 면역원성의 항체에 비해 증가된 종양 편재화 또는 감소된 혈청 반감기를 제공하는 항체(예컨대, 전장 항체 또는 이의 항원 결합 단편)를 포함할 것임을 인식할 것이다. 일 실시 형태에서, 변형 항체의 불변 영역은 인간 불변 영역을 포함할 것이다. 본 발명과 양립 가능한 불변 영역에 대한 변형은 하나 이상의 도메인에서의 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실 또는 치환을 포함한다. 즉, 본원에 개시된 변형 항체는 3가지 중쇄 불변 도메인(CH1, CH2 또는 CH3) 중 하나 이상 및/또는 경쇄 불변 도메인(CL)에 대한 변경 또는 변형을 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 하나 이상의 도메인이 부분적으로 또는 전체적으로 결실된 변형 불변 영역이 고려된다. 일 실시 형태에서, 변형 항체는 전체 CH2 도메인이 제거된 도메인 결실 구축물 또는 변이체(Δ CH2 구축물)를 포함할 것이다. 일 실시 형태에서, 생략된 불변 영역 도메인은 부재 불변 영역에 의해 전형적으로 제공되는 분자 유연성의 일부를 제공하는 짧은 아미노산 스페이서(예를 들어, 10개의 잔기)에 의해 대체될 수 있다.

[0675] 이들의 입체배치 외에도, 이러한 불변 영역이 몇몇 이펙터 기능을 매개한다는 것이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 항체는 세포의 Fc 수용체(FcR)와 결합하는 항체 Fc 영역의 Fc 수용체 부위를 이용하여, Fc 영역을 통해 세포와 결합한다. IgG(감마 수용체), IgE(에타 수용체), IgA(알파 수용체) 및 IgM(뮤 수용체)를 비롯한 다양한 부류의 항체에 대해 특이적인 Fc 수용체가 다수 존재한다. 세포 표면의 Fc 수용체에 대한 항체의 결합은 항체 코팅된 입자의 포식 및 파괴, 면역 복합체의 제거, 살해 세포에 의한 항체 코팅된 표적 세포의 용리(항체 의존적 세포 매개성 세포독성, 또는 ADCC라 함), 염증 매개자의 방출, 태반 통과 및 면역글로불린 생산 제어를 포함한 다수의 중요하고 다양한 생물학적 반응을 촉발한다.

[0676] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 결국 투여된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 생물학적 프로파일에 영향을 미치는, 변경된 이펙터 기능을 제공한다. 예를 들어, (점 돌연변이 또는 기타 수단을 통한) 불변 영역 도메인의 결실 또는 불활성화는 순환하는 변형된 항체의 Fc 수용체 결합을 감소시킬 수 있다. 다른 경우, 본 발명과 일치하는 불변 영역 변형은 보체 결합을 완화시켜, 혈청 반감기 및 접합된 세포독소의 비특이적 결합을 감소시킬 수 있다. 불변 영역의 또 다른 변형을 이용하여, 항원 특이성 또는 항체 가요성 증가로 인한 편재화 증진을 가능하게 하는 이황화 결합 또는 올리고당 모이어티를 제거할 수 있다. 유사하게, 본 발명에 따른 불변 영역에 대한 변형은 당업자의 범위 내에서 널리 공지된 생화학 또는 분자 공학 기법을 이용하여 용이하게 이루어질 수 있다.

[0677] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 이펙터 기능을 나타내지 않는다. 예를 들어, 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 의존적 세포의 세포독성(ADCC) 활성 및/또는 보체 의존적 세포독성(CDC) 활성을 나타내지 않는다. 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Fc 수용체 및/또는 보체 인자와 결합하지 않는다. 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 어떠한 이펙터 기능도 나타내지 않는다.

[0678] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 조작하여 CH3 도메인을 각각의 변형된 항체 또는 이의 단편의 힌지 영역에 직접 융합시킬 수 있다. 다른 구축물에서, 힌지 영역과 변형된 CH2 및/또는 CH3 도메인 사이

에 펩티드 스페이스가 삽입될 수 있다. 예를 들어, CH2 도메인이 결실되고, 남은 CH3 도메인(변형되거나 변형되지 않음)이 5 내지 20개의 아미노산 스페이스를 이용하여 힌지 영역에 연결된 적합한 구축물이 발현될 수 있다. 이러한 스페이스를 첨가하여, 예를 들어, 불변 도메인의 조절 요소를 자유롭게 접근 가능하게 유지하거나, 또는 힌지 영역을 가요적하게 유지할 수 있다. 아미노산 스페이스는 일부 경우에 면역원성인 것으로 판명되어, 이러한 구축물에 대해 원치 않는 면역 반응을 유발할 수 있다. 일 실시 형태에서, 이러한 구축물에 첨가되는 임의의 스페이스는 상대적으로 비 면역원성이거나, 또는 심지어 변형된 항체의 원하는 생화학적 품질을 유지하도록 전부 생략될 수 있다.

[0679] 전체 불변 영역 도메인의 결실 이외에도, 본원에 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 불변 영역의 몇 개의 또는 심지어 단일한 아미노산의 부분적 결실 또는 치환에 의해 변형될 수 있다. 예를 들어, CH2 도메인의 선택된 영역의 단일 아미노산의 돌연변이는 실질적으로 Fc 결합을 감소시켜 종양 편재화를 증가시키기에 충분할 수 있다. 마찬가지로, 이펙터 기능(예컨대, 보체 C1q 결합)을 제어하는 하나 이상의 불변 영역 도메인을 완전히 또는 부분적으로 결실시킬 수 있다. 불변 영역의 이러한 부분 결실은 대상 불변 영역 도메인과 관련된 기타 바람직한 기능을 온전하게 둔 채 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 선택된 특징(예컨대, 혈청 반감기)을 개선할 수 있다. 게다가, 항체 및 이의 항원 결합 단편의 불변 영역을, 생성된 구축물의 프로파일을 증진시키는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이 또는 치환을 통해 변형시킬 수 있다. 이와 관련하여, 변형 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 입체배치 및 면역원성 프로파일을 실질적으로 유지하면서, 보존된 결합 부위에 의해 제공되는 활성(예를 들어, Fc 결합성)을 파괴하는 것이 가능하다. 일 실시 형태에서, 불변 영역에 하나 이상의 아미노산을 부가하여 바람직한 특성을 증진시킬 수 있거나(예컨대 이펙터 기능의 감소 또는 증가), 세포독소 또는 탄수화물의 더 큰 부착성을 제공할 수 있다. 일 실시 형태에서, 선택된 불변 영역 도메인으로부터 유래된 특정 서열을 삽입 또는 복제하는 것이 바람직할 수 있다.

[0680] 본 발명은 추가로 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편(예를 들어, 무린, 키메라, 인간화 또는 인간 항체, 또는 이의 항원 결합 단편)과 실질적으로 상동성인 변이체 및 등가물을 포함한다. 이들은, 예를 들어 보존적 치환 돌연변이, 즉, 유사한 아미노산에 의한 하나 이상의 아미노산의 치환을 함유할 수 있다. 예를 들어, 보존적 치환은 아미노산을 동일한 공통 부류 내의 또 다른 아미노산으로 치환하는 것, 예를 들어 하나의 산성 아미노산을 또 다른 산성 아미노산으로, 하나의 염기성 아미노산을 또 다른 염기성 아미노산으로, 또는 하나의 중성 아미노산을 또 다른 중성 아미노산으로 치환하는 것을 지칭한다. 보존적 아미노산 치환이 의도하는 것은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0681] 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 보통은 이러한 단백질의 일부분이 아닌 추가적인 화학적 모이어티를 함유하도록 더 변형될 수 있다. 이러한 유도체화된 모이어티는 이러한 단백질의 용해도, 생물학적 반감기 또는 흡수성을 향상시킬 수 있다. 또한, 이러한 모이어티는 이러한 단백질 등의 임의의 바람직한 부작용을 감소시키거나 제거할 수 있다. 이러한 모이어티에 대한 개요는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012)]에서 찾을 수 있다.

[0682] 정의

[0683] 다음의 정의는 특히 상기 토포이소머라제 I 억제제의 설명에 관한 것으로, 더욱 특별하게는 "추가 바람직한 예"라는 표제의 섹션에 관한 것일 수 있다.

[0684] C₅₋₆ 아릴렌: 본원에서 사용되는 용어 "C₅₋₆ 아릴렌"은 방향족 화합물의 방향족 고리 원자로부터 2개의 수소 원자를 제거하여 수득되는 2가 모이어티에 관한 것이다.

[0685] 이러한 맥락에서, 접두사(예를 들어, C₅₋₆)는 탄소 원자이든 헤테로원자이든, 고리 원자의 수 또는 고리 원자 수의 범위를 나타낸다.

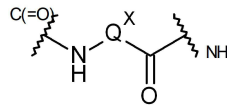
[0686] 고리 원자는 "카보아릴렌기"에서와 같이 모두 탄소 원자일 수 있고, 이 경우 기는 페닐렌(C₆)이다.

[0687] 대안적으로, 고리 원자는 "헤테로아릴렌기"에서와 같이, 하나 이상의 헤테로원자를 포함할 수 있다. 헤테로아릴렌기의 예는

[0688] N₁: 피롤(아졸)(C₅), 피리딘(아진)(C₆);

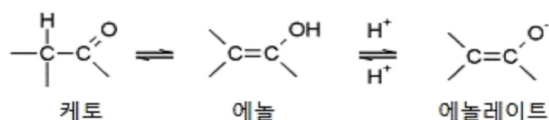
[0689] O₁: 퓨란(옥솔)(C₅);

- [0690] S₁: 티오펜(티올)(C₅);
- [0691] N₁O₁: 옥사줄(C₅), 이속사줄(C₅), 이속사진(C₆);
- [0692] N₂O₁: 옥사디아줄(퓨라잔)(C₅);
- [0693] N₃O₁: 옥사트리아줄(C₅);
- [0694] N₁S₁: 티아줄(C₅), 이소티아줄(C₅);
- [0695] N₂: 이미다줄(1,3-디아줄)(C₅), 피라줄(1,2-디아줄)(C₅), 피리다진(1,2-디아진)(C₆), 피리미딘(1,3-디아진)(C₆) (예를 들어, 시토신, 티민, 우라실), 피라진(1,4-디아진)(C₆); 및
- [0696] N₃: 트리아줄(C₅), 트리아진(C₆)으로부터 유래된 것들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0697] C₁₋₄ 알킬: 본원에서 사용되는 용어 "C₁₋₄ 알킬"은, 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 탄화수소 화합물의 탄소 원자로부터 수소 원자를 제거하여 수득되는 1가 모이어티에 관한 것으로, 지방족 또는 지환족일 수 있고, 포화 또는 불포화(예를 들어, 부분 불포화, 완전 불포화)일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "C_{1-n} 알킬"은, 1 내지 n개의 탄소 원자를 갖는 탄화수소 화합물의 탄소 원자로부터 수소 원자를 제거하여 수득되는 1가 모이어티에 관한 것으로, 지방족 또는 지환족일 수 있고, 포화 또는 불포화(예를 들어, 부분 불포화, 완전 불포화)일 수 있다. 따라서, 용어 "알킬"은 이하에서 논의되는 하위 부류인 알케닐, 알키닐, 시클로알킬 등을 포함한다.
- [0698] 포화 알킬기의 예는 메틸(C₁), 에틸(C₂), 프로필(C₃), 및 부틸(C₄)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0699] 포화 선형 알킬기의 예는 메틸(C₁), 에틸(C₂), n-프로필(C₃), 및 n-부틸(C₄)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0700] 포화 분지형 알킬기의 예는 이소-프로필(C₃), 이소-부틸(C₄), sec-부틸(C₄), tert-부틸(C₄)을 포함한다.
- [0701] C₂₋₄ 알케닐: 본원에서 사용되는 용어 "C₂₋₄ 알케닐"은 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 알킬기에 관한 것이다.
- [0702] 불포화 알케닐기의 예는 에테닐(비닐, -CH=CH₂), 1-프로페닐(-CH=CH-CH₃), 2-프로페닐(알릴, -CH=CH=CH₂), 이소프로페닐(1-메틸비닐, -C(CH₃)=CH₂), 및 부테닐(C₄)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0703] C₂₋₄ 알키닐: 본원에서 사용되는 용어 "C₂₋₄ 알키닐"은 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 알킬기에 관한 것이다.
- [0704] 불포화 알키닐기의 예는 에티닐(-C≡CH) 및 2-프로피닐(프로파길, -CH₂-C≡CH)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0705] C₃₋₄ 시클로알킬: 본원에서 사용되는 용어 "C₃₋₄ 시클로알킬"은 시클릴기이기도 한 알킬기에 관한 것으로; 즉, 시클릭 탄화수소(카보시클릭) 화합물의 지환족 고리 원자로부터 수소 원자를 제거함으로써 수득되는 1가 모이어티이고, 모이어티는 3 내지 7개의 고리 원자를 포함하는 3 내지 7개의 탄소 원자를 갖는다.
- [0706] 시클로알킬기의 예는 하기로부터 유래된 것을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다:
- [0707] 포화 단환식 탄화수소 화합물:
- [0708] 시클로프로판(C₃) 및 시클로부탄(C₄); 및
- [0709] 불포화 단환식 탄화수소 화합물:
- [0710] 시클로프로펜(C₃) 및 시클로부텐(C₄).



- [0711] 연결 표시: 화학식 $\text{C}(=\text{O})$ 및 NH 는 원자들이 결합되는 기를 나타낸다. 예를 들어, NH기는 (예시된 모이어티의 일부가 아닌) 카르보닐에 결합되는 것으로 표시되고, 카르보닐은 (예시된 모이어티의 일부가 아닌) NH기에 결합되는 것으로 표시된다.
- [0712] 염
- [0713] 활성 화합물/작용제의 상응하는 염, 예를 들어 제약상 허용 가능한 염을 제조, 정제 및/또는 취급하는 것이 편리하거나 바람직할 수 있다. 제약상 허용 가능한 염의 예는 문헌[Berge, *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 1-19 (1977)]에 논의되어 있다.
- [0714] 예를 들어, 화합물이 음이온성이거나, 음이온성일 수 있는 작용기를 갖는 경우(예를 들어, $-\text{COOH}$ 는 $-\text{COO}^-$ 일 수 있음), 적합한 양이온을 사용하여 염이 형성될 수 있다. 적합한 무기 양이온의 예는 Na^+ 및 K^+ 와 같은 알칼리 금속 이온, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 와 같은 알칼리토류 양이온, 및 Al^{+3} 과 같은 기타 양이온을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 적합한 유기 양이온의 예는 암모늄 이온(즉, NH_4^+) 및 치환된 암모늄 이온(예를 들어, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 적합한 치환된 암모늄 이온의 예는 에틸아민, 디에틸아민, 디시클로헥실아민, 트리에틸아민, 부틸아민, 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페라진, 벤질아민, 페닐벤질아민, 콜린, 메글루민 및 트로메타민 뿐만 아니라 아미노산, 예컨대, 라이신 및 아르기닌으로부터 유래된 것들이다. 일반적인 4차 암모늄 이온의 예는 $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ 이다.
- [0715] 화합물이 양이온성이거나, 양이온성일 수 있는 작용기를 갖는 경우(예를 들어, $-\text{NH}_2$ 는 $-\text{NH}_3^+$ 일 수 있음), 적합한 음이온을 사용하여 염이 형성될 수 있다. 적합한 무기 음이온의 예는 하기 무기산으로부터 유래된 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 황산, 아황산, 질산, 아질산, 인산 및 아인산.
- [0716] 적합한 유기 음이온의 예는 하기 유기산으로부터 유래된 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 2-아세틸옥시벤조산, 아세트산, 아스코르브산, 아스파르트산, 벤조산, 캄포르선포산, 신남산, 시트르산, 에데트산, 에탄디선포산, 에탄선포산, 푸마르산, 글루세톤산, 글루콘산, 글루탐산, 글리콜산, 하이드록시말레산, 하이드록시나프탈렌 카복실산, 이세티온산, 락트산, 락토비온산, 라우르산, 말레산, 말산, 메탄선포산, 뮤신산, 올레산, 옥살산, 팔미트산, 팜산, 판토텐산, 페닐아세트산, 페닐선포산, 프로피온산, 피루브산, 살리실산, 스테아르산, 숙신산, 설파닐산, 타르타르산, 툴루엔선포산, 트리플루오로아세트산, 및 발레르산. 적합한 고분자 유기 음이온의 예는 탄닌산, 카복시메틸 셀룰로스와 같은 고분자 산으로부터 유래된 것들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0717] 용매화물
- [0718] 활성 화합물의 상응하는 용매화물을 제조, 정제, 및/또는 취급하는 것이 편리하거나 바람직할 수 있다. 용어 "용매화물"은 용질(예를 들어, 활성 화합물, 활성 화합물의 염)과 용매의 복합체를 지칭하는 통상적인 의미로 본원에서 사용된다. 용매가 물인 경우, 용매화물은 편의상 수화물, 예를 들어 일수화물, 이수화물, 삼수화물 등으로 지칭될 수 있다.
- [0719] 이성체
- [0720] 본 발명의 특정 화합물/작용제는 시스- 및 트랜스-형태; E- 및 Z-형태; c-, t-, 및 r-형태; 엔도- 및 엑소-형태; R-, S-, 및 메소 형태; D- 및 L-형태; d- 및 l-형태; (+) 및 (-) 형태; 케토-, 에놀-, 및 에놀레이트-형태; syn- 및 anti-형태; 향사- 및 배사-형태; α - 및 β -형태; 축상 및 수평방향 형태; 보트-, 의자-, 꼬임-, 봉투-, 및 반의자-형태; 및 이들의 조합을 포함하는(이에 한정되지 않음) 하나 이상의 특정한 기하, 광학, 거울상이성체, 부분입체이성체, 에피머, 아트로프, 입체이성체, 호변이성체, 배좌, 또는 아노머 형태로 존재할 수 있고, 이하에서는 통칭하여 "이성체"(또는 "이성체 형태")로 지칭한다.
- [0721] 용어 "키랄"은 거울상 파트너의 중첩할 수 없는 성질을 갖는 분자를 지칭하고, 반면, 용어 "아키랄"은 거울상 파트너에 중첩될 수 있는 분자를 지칭한다.

- [0722] 용어 "입체이성체"는 동일한 화학적 구성을 갖지만, 공간 내의 원자 또는 기의 배열에 있어서 상이한 화합물을 지칭한다.
- [0723] "부분입체이성체"는 2개 이상의 키랄 중심을 갖고 분자가 서로 거울상이 아닌 입체이성체를 지칭한다. 부분입체이성체는 융점, 비등점, 분광 특성, 및 반응성과 같은 물리적 성질이 다르다. 부분입체이성체의 혼합물은 고해상도 분석 절차, 예컨대 전기영동 및 크로마토그래피로 분리될 수 있다.
- [0724] "거울상이성체"는 서로 중첩되지 않는 거울상인, 화합물의 2개의 입체이성체를 지칭한다.
- [0725] 본원에서 사용된 입체화학적 정의 및 관례는 일반적으로 문헌[S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 및 Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994]에 따른 것이다. 본 발명의 화합물은 비대칭 또는 키랄 중심을 포함할 수 있으므로, 서로 다른 입체이성체 형태로 존재한다. 본 발명의 화합물의 모든 입체이성체 형태(부분입체이성체, 거울상이성체, 및 회전장애이성체를 포함하나 이에 한정되지 않음)뿐만 아니라, 라세미 혼합물과 같은 이들의 혼합물도 본 발명의 일부를 형성하는 것으로 의도된다. 많은 유기 화합물은 광학적으로 활성인 형태로 존재하는데, 즉 이들은 평면-편광의 평면을 회전시킬 수 있는 능력을 갖는다. 광학적으로 활성인 화합물을 설명함에 있어서, 이의 키랄 중심(들)에 대한 분자의 절대 배열을 나타내기 위해 접두사 D 및 L, 또는 R 및 S가 사용된다. 화합물에 의한 평면-편광 회전의 부호를 나타내기 위해 접두사 d 및 l 또는 (+) 및 (-)가 사용되며, (-) 또는 l는 화합물이 좌선성임을 의미한다. (+) 또는 d가 접두사로 붙은 화합물은 우선성이다. 제시된 화학 구조에 있어서, 이러한 입체이성체는 서로 거울상이라는 점을 제외하면 동일하다. 특정 입체이성체는 또한 거울상이성체로서 지칭될 수 있고, 이러한 이성체의 혼합물은 종종 거울상이성체 혼합물로 불린다. 거울상이성체의 50:50 혼합물은 화학 반응 또는 과정에서 입체선택성 또는 입체특이성이 없는 경우에 발생할 수 있는 라세미 혼합물 또는 라세미체로 지칭된다. 용어 "라세미 혼합물" 및 "라세미체"는 광학적 활성이 없는, 2개의 거울상이성체 종의 등물 혼합물을 지칭한다.
- [0726] "거울상이성체 풍부 형태"는 거울상이성체 비율이 50:50 초과 100:0 미만인 키랄 물질의 샘플을 지칭한다.
- [0727] 본원에서 사용되는 바와 같이, 호변이성체 형태에 대해 이하에 논의되는 것을 제외하고는, 본원에서 사용되는 용어 "이성체"로부터 구체적으로 구조(또는 구성) 이성체(즉, 단지 공간내 원자의 위치가 아닌 원자간의 연결이 상이한 이성체)는 제외된다. 예를 들어, 메톡시기 -OCH₃에 대한 언급은 이의 구조 이성체인 하이드록시메틸기 -CH₂OH에 대한 언급으로 해석되어서는 안 된다. 마찬가지로, 오르토-클로로페닐에 대한 언급은 이의 구조 이성체인 메타-클로로페닐에 대한 언급으로 해석되어서는 안 된다. 그러나, 구조 부류를 언급할 경우, 해당 부류에 속하는 구조 이성체 형태를 적절히 포함할 수 있다(예를 들어, C₁₋₇ 알킬은 n-프로필 및 이소-프로필을 포함하며; 부틸은 n-, 이소-, sec-, 및 tert-부틸을 포함하고; 메톡시페닐은 오르토-, 메타-, 및 파라-메톡시페닐을 포함한다).
- [0728] 상기 제외는 예를 들어, 다음 호변이성질체 쌍에서와 같은 호변이성체 형태, 예를 들어 케토-, 에놀- 및 에놀레이트-형태에 적용되지 않는다: 케토/에놀(아래에 설명됨), 이민/엔아민, 아마이드/이미노 알코올, 아마idin/엔디아민, 니트로소/옥심, 티오케톤/엔티올, N-니트로소/히드록시아조 및 니트로/아시-니트로.



- [0729]
- [0730] 용어 "호변이성체" 또는 "호변이성체 형태"는 낮은 에너지 장벽을 통해 상호전환될 수 있는 상이한 에너지를 갖는 구조 이성체를 지칭한다. 예를 들어, 양성자 호변이성체(양성자 이전성 호변이성체로도 알려져 있음)는 양성자의 이동을 통한 상호전환, 예컨대 케토-에놀 및 이민-엔아민 이성체화를 포함한다. 원자가 호변이성체는 결합 전자 중 일부 전자의 재편성에 의한 상호전환을 포함한다.
- [0731] 용어 "이성체"에 하나 이상의 동위원소 치환을 갖는 화합물이 구체적으로 포함된다는 점에 주의한다. 예를 들어, H는 ¹H, ²H(D), 및 ³H(T)를 포함하는 임의의 동위원소 형태로 존재할 수 있고; C는 ¹²C, ¹³C, 및 ¹⁴C를 포함하는 임의의 동위원소 형태로 존재할 수 있으며; O는 ¹⁶O 및 ¹⁸O를 포함하는 임의의 동위원소 형태로 존재할 수 있다.

- [0732] 본 발명의 화합물에 혼입될 수 있는 동위원소의 예는 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 불소, 염소, 및 요오드의 동위원소, 예컨대 ^2H (중수소, D), ^3H (삼중수소), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , 및 ^{125}I 를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 다양한 동위원소 표지 화합물은, 예를 들어, ^3H , ^{13}C , 및 ^{14}C 와 같은 방사성 동위원소가 혼입된 화합물이다. 이러한 동위원소 표지 화합물은 대사 연구, 반응 동역학 연구, 약물 또는 기질 조직 분포 분석을 포함하여 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 단일-광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT)과 같은 검출 또는 이미징 기법, 또는 환자의 방사선 치료에 유용할 수 있다. 본 발명의 중수소 표지되거나 치환된 치료 화합물은 분포, 대사, 및 배설(ADME)과 관련하여, 개선된 DMPK(약물 대사 및 약동학) 특성을 가질 수 있다. 중수소와 같은 보다 무거운 동위원소에 의한 치환은 보다 큰 대사 안정성으로 얻어지는 특정 치료적 이점(예를 들어, 생체 내 반감기 증가 또는 필요 투약량 감소)을 제공할 수 있다. ^{18}F 로 표지된 화합물은 PET 또는 SPECT 연구에 유용할 수 있다. 본 발명의 동위원소 표지 화합물 및 이의 프로드럭은 일반적으로 동위원소 비표지 시약을 용이하게 입수할 수 있는 동위원소 표지 시약으로 대체함으로써 하기 기재된 반응식 또는 실시예 및 제조에 개시된 절차를 수행하여 제조될 수 있다. 또한, 보다 무거운 동위원소, 특히 중수소(즉, ^2H 또는 D)에 의한 치환은 보다 더 큰 대사 안정성으로 얻어지는 특정 치료적 이점, 예를 들어 생체 내 반감기의 증가 또는 투약 요건의 감소 또는 치료지수의 개선을 제공할 수 있다. 이러한 맥락에서 중수소는 치환기로 간주되는 것으로 이해된다. 이러한 보다 무거운 동위원소, 구체적으로 중수소의 농도는 동위원소 농축 계수에 의해 정의될 수 있다. 본 발명의 화합물에서 특정 동위원소로 구체적으로 지정되지 않은 임의의 원자는 그 원자의 임의의 안정한 동위원소를 나타내는 것으로 의도된다.
- [0733] 달리 명시되지 않는 한, 특정 화합물에 대한 언급은 (전체적으로 또는 부분적으로) 라세미 및 이의 다른 혼합물을 포함하는 상기 모든 이성체 형태를 포함한다. 상기 이성체 형태의 제조방법(예를 들어, 비대칭 합성) 및 분리방법(예를 들어, 분별 결정화 및 크로마토그래피 방식)은 당해 분야에 공지되어 있거나, 본원에 교시된 방법 또는 공지된 방법을 공지된 방식으로 적용함으로써 용이하게 수득된다.
- [0734] 서열 상동성
- [0735] 전역 방법, 국소적 방법 및 하이브리드 방법, 예를 들어, 세그먼트 접근 방법을 제한 없이 포함하는 임의의 다양한 서열 정렬 방법을 사용하여 동일성 퍼센트를 결정할 수 있다. 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 프로토콜은 당업자의 범주 내의 일상적인 절차이다. 전역 방법은 분자의 처음부터 끝까지 서열들을 정렬하고, 개별 잔기 쌍의 스코어의 합산 및 갭 페널티의 부과에 의해 최상의 정렬을 결정한다. 비제한적인 방법은 예를 들어 CLUSTAL W(예를 들어, 문헌[Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994)] 참조); 및 반복 개선(예를 들어, 문헌[Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996)] 참조)을 포함한다. 국소적 방법은 모든 입력 서열들이 공유하는 하나 이상의 보존된 모티프를 식별하여 서열들을 정렬한다. 비제한적인 방법은 예를 들어 Match-box(예를 들어, 문헌[Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501-509 (1992)] 참조); Gibbs 샘플링(예를 들어, 문헌[C. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) Science 208-214 (1993)] 참조); Align-M(예를 들어, 문헌[Ivo Van Waile et al., Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) Bioinformatics:1428-1435 (2004)] 참조)을 포함한다.
- [0736] 따라서, 서열 동일성 퍼센트는 통상적인 방법에 의해 결정된다. 예를 들어, 문헌[Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48: 603-16, 1986] 및 문헌[Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19, 1992]을 참조한다. 간단히 말해서, 2개의 아미노산 서열은 10의 갭 개방 페널티, 1의 갭 확장 페널티, 및 Henikoff 및 Henikoff(상기 문헌)의 "blosom 62" 스코어링 매트릭스를 사용하여 정렬 스코어를 최적화하도록 정렬되며, 이는 아래에 나타낸 바와 같다(아미노산은 표준 1문자 코드로 표시됨).
- [0737] 2개 이상의 핵산 또는 아미노산 서열 사이의 "서열 동일성 퍼센트"는 이 서열들이 공유하는 동일한 위치의 수의 함수이다. 따라서 동일성 %는 동일한 뉴클레오타이드/아미노산의 수를 총 뉴클레오타이드/아미노산 수로 나눈 값에 100을 곱한 것으로 계산될 수 있다. 서열 동일성 %의 계산은 또한 갭의 수 및 길이, 및 2개 이상의 서열의 정렬을 최적화하기 위해 도입될 필요가 있는 각각의 갭의 길이를 고려할 수 있다. 서열 비교 및 2개 이상의 서열 사

이의 동일성 퍼센트의 결정은 BLAST와 같은 특정한 수학적 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있으며, 이는 당업자에게 친숙할 것이다.

[0738] 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬 스코어

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

[0739]

[0740] 이어서, 동일성 퍼센트는 하기와 같이 계산된다:

$$\frac{\text{동일한 매치의 총 수}}{\text{[더 긴 서열의 길이 + 두 서열을 정렬하기 위해 더 긴 서열 내로 도입된 갭의 수]}} \times 100$$

[0741]

[0742] 실질적으로 상동성인 폴리펩티드들은 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 것을 특징으로 한다. 이러한 변화는 바람직하게는 사소한 성질의 것, 즉, 보존적 아미노산 치환(아래 참조) 및 폴리펩티드의 폴딩 또는 활성에 유의미한 영향을 미치지 않는 기타 치환; 전형적으로 1 내지 약 30개의 아미노산의 작은 결실; 및 작은 아미노- 또는 카르복실-말단 연장부, 예컨대 아미노-말단 메티오닌 잔기, 최대 약 20~25개 잔기의 작은 링커 펩티드, 또는 친화성 태그이다.

[0743]

보존적 아미노산 치환

[0744]

염기성: 아르기닌; 라이신; 히스티딘

[0745]

산성: 글루탐산; 아스파르트산

[0746]

극성: 글루타민; 아스파라긴

[0747]

소수성: 류신; 이소류신; 발린

- [0748] 방향족: 페닐알라닌; 트립토판; 티로신
- [0749] 작은 아미노산: 글리신; 알라닌; 세린; 트레오닌; 메티오닌
- [0750] 20개의 표준 아미노산에 더하여, 비표준 아미노산(예컨대 4-히드록시프롤린, 6-N-메틸 라이신, 2-아미노이소부티르산, 이소발린 및 α -메틸 세린)이 본 발명의 폴리펩티드의 아미노산 잔기를 치환할 수 있다. 제한된 수의 비 보존적 아미노산, 유전자 코드에 의해 암호화되지 않는 아미노산 및 비 천연 아미노산이 폴리펩티드 아미노산 잔기를 치환할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 또한 비 천연 발생 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.
- [0751] 비 천연 발생 아미노산은 트랜스-3-메틸프롤린, 2,4-메타노-프롤린, 시스-4-하이드록시프롤린, 트랜스-4-하이드록시-프롤린, N-메틸글리신, 알로-트레오닌, 메틸-트레오닌, 하이드록시-에틸시스테인, 하이드록시에틸호모-시스테인, 니트로-글루타민, 호모글루타민, 피페콜산, tert-류신, 노르발린, 2-아자페닐알라닌, 3-아자페닐-알라닌, 4-아자페닐-알라닌 및 4-플루오로페닐알라닌을 제한 없이 포함한다. 비 천연 발생 아미노산 잔기를 단백질에 혼입시키기 위한 여러 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 넨센스 돌연변이가 화학적으로 아미노아실화된 억제자 tRNA를 사용하여 억제되는 시험관 내 시스템이 사용될 수 있다. 아미노산을 합성하고 tRNA를 아미노아실화하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 넨센스 돌연변이를 함유하는 플라스미드의 전사 및 번역은 E. 콜라이 S30 추출물 및 상업적으로 이용 가능한 효소 및 기타 시약을 포함하는 무세포 시스템에서 수행된다. 단백질은 크로마토그래피로 정제된다. 예를 들어, 문헌[Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991]; 문헌[Ellman et al., Methods Enzymol. 202:301, 1991]; 문헌[Chung et al., Science 259:806-9, 1993]; 및 문헌[Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10145-9, 1993)] 참조. 두 번째 방법에서, 번역은 돌연변이 mRNA 및 화학적으로 아미노아실화된 억제자 tRNA의 미세주입에 의해 제노푸스(Xenopus) 난모세포에서 수행된다(Turcattiet al., J. Biol. Chem. 271:19991-8, 1996). 세 번째 방법 내에서, E. 콜라이 세포는 대체될 천연 아미노산(예를 들어, 페닐알라닌)의 부재 및 원하는 비 천연 발생 아미노산(들)(예를 들어, 2-아자페닐알라닌, 3-아자페닐알라닌, 4-아자페닐알라닌, 또는 4-플루오로페닐알라닌)의 존재 하에 배양된다. 비 천연 발생 아미노산은 천연 대응물 대신에 폴리펩티드에 포함된다. 문헌[Koide et al., Biochem. 33:7470-6, 1994] 참조. 천연 발생 아미노산 잔기는 시험관 내 화학적 변형에 의해 비 천연 발생 종으로 전환될 수 있다. 화학적 변형은 치환 범위를 더욱 확장하기 위해 부위 특이적 돌연변이 유발과 조합될 수 있다(Wynn and Richards, Protein Sci. 2:395-403, 1993).
- [0752] 제한된 수의 비 보존적 아미노산, 유전자 코드에 의해 암호화되지 않는 아미노산, 비 천연 발생 아미노산 및 비 천연 아미노산은 본 발명의 폴리펩티드의 아미노산 잔기를 치환할 수 있다.
- [0753] 본 발명의 폴리펩티드의 필수 아미노산은 부위 특이적 돌연변이 유발 또는 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발과 같은 당업계에 공지된 절차에 따라 확인될 수 있다(문헌[Cunningham and Wells, Science 244: 1081-5, 1989]). 생물학적 상호작용 부위는 또한 추정 접촉 부위 아미노산의 돌연변이와 함께 핵 자기 공명, 결정학, 전자 회절 또는 광친화성 표지와 같은 기술에 의해 결정되는 바와 같은 구조의 물리적 분석에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 문헌[de Vos et al., Science 255:306-12, 1992]; 문헌[Smith et al., J. Mol. Biol. 224:899-904, 1992]; 문헌[Wlodaver et al., FEBS Lett. 309:59-64, 1992] 참조. 필수 아미노산들의 동일성은 또한 본 발명의 폴리펩티드의 관련 성분(예를 들어, 전위 또는 프로테아제 성분)과의 상동성의 분석으로부터 추론될 수 있다.
- [0754] 문헌[Reidhaar-Olson and Sauer (Science 241:53-7, 1988)] 또는 문헌[Bowie and Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-6, 1989)]에 개시된 것과 같은 공지된 돌연변이 유발 및 스크리닝 방법을 사용하여 다중 아미노산 치환을 만들고 테스트할 수 있다. 간단히 말해서, 이들 저자는 폴리펩티드에서 2개 이상의 위치를 동시에 무작위화하고, 기능성 폴리펩티드를 선택하고, 그 후 돌연변이 유발된 폴리펩티드를 서열결정하여 각각의 위치에서의 허용가능한 치환의 스펙트럼을 결정하는 방법을 개시한다. 사용될 수 있는 다른 방법은 파지 디스플레이(예를 들어, 문헌[Lowman et al., Biochem. 30:10832-7, 1991]; Ladner 등의 미국 특허 제5,223,409호; Huse, WIPO 공보 WO 92/06204) 및 영역-유도 돌연변이 유발(문헌[Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986]; 문헌[Ner et al., DNA 7:127, 1988])을 포함한다.
- [0755] 문헌[Reidhaar-Olson and Sauer (Science 241:53-7, 1988)] 또는 문헌[Bowie and Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-6, 1989)]에 개시된 것과 같은 공지된 돌연변이 유발 및 스크리닝 방법을 사용하여 다중 아미노산 치환을 만들고 테스트할 수 있다. 간단히 말해서, 이들 저자는 폴리펩티드에서 2개 이상의 위치를 동시에 무작위화하고, 기능성 폴리펩티드를 선택하고, 그 후 돌연변이 유발된 폴리펩티드를 서열결정하여 각각의 위치에서의 허용가능한 치환의 스펙트럼을 결정하는 방법을 개시한다. 사용될 수 있는 다른 방법은 파지 디스플레이(예를 들어, 문헌[Lowman et al., Biochem. 30:10832-7, 1991]; Ladner 등의 미국 특허 제5,223,409호; Huse,

WIPO 공보 WO 92/06204) 및 영역-유도 돌연변이 유발(문헌[Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986]; 문헌[Ner et al., DNA 7:127, 1988])을 포함한다.

- [0756] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 숙련자에 의해 보편적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 문헌[Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994)], 및 문헌[Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991)]은 본 발명에서 사용되는 많은 용어의 일반 사전을 당업자에게 제공한다.
- [0757] 본 발명은 본원에 개시된 예시적인 방법 및 재료에 의해 한정되지 않으며, 본원에 기재된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 형태의 실시 또는 테스트에서 사용될 수 있다. 수치 범위는 그 범위를 한정하는 수치를 포함한다. 달리 지시되지 않는 한, 각각 임의의 핵산 서열은 좌측으로부터 우측으로 5'으로부터 3' 배향으로 기재되고; 아미노산 서열은 좌측으로부터 우측으로 아미노로부터 카복시 배향으로 기재된다.
- [0758] 본원에 제공된 표제는 본 발명의 다양한 양태 또는 실시 형태를 제한하는 것이 아니다.
- [0759] 아미노산은 아미노산의 명칭, 3문자 약어 또는 1문자 약어를 사용하여 본원에서 언급된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단백질"은 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아미노산 서열"은 용어 "폴리펩티드" 및/또는 용어 "단백질"과 동의어이다. 일부 예에서, 용어 "아미노산 서열"은 용어 "펩티드"와 동의어이다. 일부 경우에, 용어 "아미노산 서열"은 용어 "효소"와 동의어이다. 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 본 발명 및 청구범위에서, 아미노산 잔기에 대한 통상적인 1문자 및 3문자 코드가 사용될 수 있다. 아미노산에 대한 3문자 코드는 IUPACIUB 생화학적 명명법에 관한 공동 위원회(JCBN)에 따라 정의된 바와 같다. 폴리펩티드는 유전자 코드의 축퇴성으로 인해 하나 초과 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화될 수 있음이 또한 이해된다.
- [0760] 용어의 다른 정의는 명세서 전체에 걸쳐 나타날 수 있다. 예시적인 실시 형태가 더 상세하게 설명되기 전에, 본 발명은 설명된 특정 실시 형태로 제한되지 않고, 그 자체로 변경될 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본원에서 사용된 용어는 단지 특정한 실시 형태를 설명하기 위한 것이며, 한정하고자 하는 것이 아님을 이해해야 하며, 그 이유는 본 발명의 범주가 첨부된 청구범위에 의해서만 정의될 것이기 때문이다.
- [0761] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥에서 명확하게 달리 지시하지 않는 한, 상기 범위의 상한과 하한 사이의 각각의 개재 값이 또한 하한치 단위의 10분의 1까지 구체적으로 개시되는 것으로 이해된다. 언급된 범위의 임의의 언급된 값 또는 개재 값과 상기 언급된 범위의 임의의 다른 언급된 값 또는 개재 값 사이의 각각의 더 작은 범위는 본 발명 내에 포함된다. 이러한 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 그 범위에 포함되거나 제외될 수 있으며, 더 작은 범위에 어느 하나가 포함되거나, 둘 다 포함되지 않거나 둘 모두가 포함되는 각각의 범위도 본 발명에 포함된다(언급된 범위 내의 임의의 구체적으로 제외된 한계치를 조건으로). 언급된 범위가 한계치들 중 하나 또는 이들 둘 다를 포함하는 경우, 포함된 한계치들 중 하나 또는 이들 둘 다를 제외한 범위도 본 발명에 포함된다.
- [0762] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수형("a", "an" 및 "the")은 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다는 점에 유의해야 한다. 따라서, 예를 들어, "작용제"에 대한 언급은 복수의 이러한 작용제를 포함하고, "작용제"에 대한 언급은 당업자에게 공지된 하나 이상의 작용제 및 이의 등가물에 대한 언급을 포함하며, 기타 등등이다.
- [0763] 본원에 논의된 간행물은 단지 본 출원의 출원일 이전에 공개될 목적으로 제공된다. 여기에 있는 어떤 것도 그러한 간행물이 여기에 첨부된 청구범위에 대한 선행 기술을 구성한다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0764] 실시예
- [0765] 재료 및 방법
- [0766] 단백질 시약
- [0767] 생성된 단백질 시약(예를 들어, 구축물)은 표 1에 제시되어 있다. 표는 단백질이 유래된 종(인간, 마우스 또는 시노물구스), 구축물을 클로닝하는 데 사용된 벡터 및 사용된 리더 서열이 천연인지 인간 CD33 리더 서열인지를

나타낸다.

[0768] 표 1. B7H4 프로젝트를 위해 제조된 단백질 구축물

클로닝된 삽입물	벡터	설명
인간 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Fc_6His	천연 리더
마우스 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Fc_6His	천연 리더
인간 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Flag_10His	천연 리더
마우스 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Flag_10His	천연 리더
시노 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Flag_10His	천연 리더
인간 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	천연 리더 삼중 돌연변이 Fc
마우스 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	천연 리더 삼중 돌연변이 Fc
시노 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	천연 리더 삼중 돌연변이 Fc
인간 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_N_CD33_10His_FLAG	인간 CD33 리더
인간 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_N_CD33_C_mIgG2a_Fc_10His	인간 CD33 리더
인간 B7H4 ECD (SV)	pDest12.2 oriP_N_CD33_10His_FLAG	인간 CD33 리더 스플라이스 변이체

[0769]

[0770] "삼중 돌연변이 Fc"(TM)는 이전에 문헌[Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2008 Jun 1; 64(Pt 6): 700-704](본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이 Fc 영역 내의 돌연변이인 삼중 돌연변이 L234F/L235E/P331S를 포함한다. 의심의 여지를 없애기 위해, 본 발명자들은 이하에 기재된 항체가 이러한 TM의 부재 하에서도(예를 들어, WT Fc가 존재하는 경우) 이의 유리한 결합 특성/프로파일을 유지함을 발견하였다.

[0771] 표의 모든 단백질은 표준 조건을 사용하여 정제되었다. 요약하면, 발현은 HEK EBNA에서 수행되었고, TFF 농도 설정을 사용하여 농축되었으며, (10His 플래그 태그가 존재하는지 또는 Fc 태그가 존재하는지에 따라) His 트랩 컬럼 또는 단백질 G 컬럼을 사용하여 정제 후 SEC S200 컬럼의 최종 정련 단계가 수행되었다.

[0772] ELISA

[0773] B7-H4(예를 들어, 인간 및 마우스 B7-H4)에 대한 항-B7-H4 항체(예를 들어, 중간체 ZYOEQD-E02-GL 및 항-B7-H4 mAb D11)의 결합을 ELISA로 측정했다. 제조항 B7-H4-Fc(예를 들어, 인간 B7-H4-Fc 및 마우스 B7-H4-Fc) 단백질을 DPBS로 희석하여 5 ug/ml 용액을 제공했다. 이어서, 50 μ L의 희석된 스톱을 Nunc Maxisorp 96 웰 플레이트에 첨가하였다. 50 μ L/웰 DPBS를 대조군 웰에 첨가하였다. 항원을 4°C에서 밤새 플레이트에 흡착시키고, DPBS로 1회 세척하고, 차단 완충액(DPBS 중 3% w/v Marvel)과 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 플레이트를 PBS로 1회 세척하고 1% BSA, 0.3% 트리톤 X-100을 함유하는 DPBS에 희석된 6.4 pM~100 nM의 항-B7-H4 항체(예를 들어, 중간체 ZYOEQD-E02-GL 또는 항-B7-H4 mAb D11)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 플레이트를 0.1% Tween을 포함하는 PBS로 3회 세척하고 과산화효소 접합된 염소 항-인간 경쇄 항체(Sigma Aldrich, 영국 풀 소재)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 플레이트를 0.1% Tween을 포함하는 PBS로 5회 세척하였다. TMB 과산화효소 기질과 함께 5분 동안 인큐베이션한 후, 0.5 M H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 450 nm에서의 흡광도(A450)는 Envision 멀티라벨 플레이트 판독기(Perkin Elmer, 영국 시어그린 소재)를 사용하여 측정하였다.

[0774] 유동 세포분석법(B7-H4 양성 세포에 결합하는 항체 검출용)

[0775] 아큐타제(accutase)(Gibco, 영국 페이즐리 소재)에 의해 조직 배양 플라스크로부터 세포를 분리하고, 원심분리에 의해 펠릿화하고, 빙냉 DPBS(Gibco, 영국 페이즐리 소재)에 재현탁시켰다. 살아있는 세포를 혈구계산기를 사용하여 트리판 블루 배제로 계수하였다. 세포 밀도를 DPBS에서 5x10⁶개 세포/mL까지 조정하였다. 100 μ L의 세포 현탁액(5x10⁵개 세포)을 96-웰 V-바닥 플레이트에 첨가하고 얼음 위에 두었다. 그런 다음, 세포를 얼음 위에

서 20분 동안 생/사 고정 가능한 바이올렛 착색제(ThermoFisher Scientific, 영국 러프버러 소재)와 함께 인큐베이션하였다. 유동 세포분석법 완충액(eBiosciences, 영국 해트필드 소재)으로 세척한 후, 세포를 100 μ L 유동 세포분석법 완충액 단독(염색되지 않은 대조군 세포)에서 또는 10 μ g/ml 내지 78 ng/ml 범위의 농도의 AF647-표지된 항-B7H4 항체(예를 들어, E02- GL 또는 1D11) 또는 이소형 R347이 보충된 100 μ L 유동 세포분석법 완충액에서 30분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 200 μ L 빙냉 유동 세포분석법 완충액으로 3회 세척하고, 200 μ L의 4% 파라포름알데히드(Sigma Aldrich, 영국 폴 소재)로 20분 동안 고정하고, FACSCanto II 기기(BD Biosciences, 미국 캘리포니아 주 산호세 소재)에서 유동 세포분석법을 위해 얼음 위의 DPBS에 현탁시켰다. FlowJo 세포측정 분석 소프트웨어(Treestar, 미국 오리건 주 애쉬랜드 소재)를 사용하여 다음과 같이 세포에 대한 항체 결합을 정량화했다. 살아있는 단일 세포를 전방 산란, 측면 산란 및 생/사 바이올렛 형광 강도를 기초로 하여 게이팅하고, AF647 기하 평균 형광 강도(MFI)를 결정하였다.

[0776] 세포독성 분석

[0777] 아큐타제(Gibco, 영국 페이즐리 소재)에 의해 조직 배양 플라스크로부터 세포주를 분리하고, 원심분리에 의해 펠렛화하고, 성장 배지(HT29-hB7H4 클론 44의 경우, McCoy's 5A, 10% FBS, G418 400 μ g/mL, SKBR3의 경우 McCoy's 5A, 10% FBS, HCC1569의 경우 RPMI-1640, 10% FBS)에 재현탁시켰다. 살아있는 세포를 혈구계산기를 사용하여 트리판 블루 배제로 계수하였다. 세포 밀도를 성장 배지에서 2.7×10^4 개 세포/mL까지 조정하였다. 75 μ L/웰의 세포 현탁액(2×10^3 개 세포)을 96-웰 백색 웰의 투명 바닥 조직 배양 처리 플레이트에 첨가하고 가습 조직 배양 인큐베이터에서 37°C, 5% CO₂에서 밤새 배양하였다.

[0778] ADC(예를 들어, 1D11-MMAE, E02-GL-MMAE 및 E02-GL-SG3249)를 DPBS로 희석하여 각각 400 μ g/mL 또는 16 μ g/mL 스톱을 제공하였다. 스톱의 4배 연속 희석액을 DPBS에 제조하였다. 그런 다음 희석된 스톱 25 μ L를 항체(예를 들어, 1D11-MMAE 또는 E02-GL-MMAE 또는 E02-GL-SG3249)의 10점, 4배 연속 희석액과 함께 배양된 세포의 2회 반복(duplicate) 웰에 첨가했다. 25 μ L/웰 DPBS를 모의 처리된 대조군 세포에 첨가하였다.

[0779] 세포를 6일 동안 ADC 또는 DPBS(모의 처리된 대조군 세포)의 존재 하에 배양하였다. CellTiter-Glo® 분석법을 사용하여 세포 생존율을 평가하였다. 100 μ L의 CellTiter-Glo®(Promega, 영국 사우샘프턴 소재)를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 벤치탑 진탕기에서 2분 동안 교반한 다음, 추가 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 발광을 Envision 멀티라벨 플레이트 판독기(Perkin Elmer, 영국 시어그린 소재)를 사용하여 측정하였다. GraphPad Prism, 버전 7(GraphPad Software, 미국 캘리포니아 주 라호이아 소재)에서 비선형 회귀 모델[로그 효능제 vs. 반응 - 가변 기울기(3개의 매개변수)]를 사용하여 절반 최대 억제 농도(IC₅₀) 값을 생성하여 테스트 품목 항체(예를 들어, 1D11-MMAE 또는 E02-GL-MMAE 또는 E02-GL-SG3249)에 대한 효능을 결정하고 모의 처리된 대조군 세포에 대한 세포 생존율 백분율로 제시하였다 -

[0780]
$$([(\text{처리된 세포} - \text{배경}) / (\text{모의 처리된 대조군 세포} - \text{배경})) \times 100).$$

[0781] 온셀 웨스턴(On-cell western)

[0782] 온셀 웨스턴 방법을 개발하여 다음 세포와 함께 5개의 예시 항체 클론을 실행하는 데 사용하였다: SKBR3, A549, OVCAR4(모두 B7-H4 벡터로의 마이너스 형질감염), CHO 및 HEK 세포(전장 B7-H4 벡터로의 플러스 및 마이너스 형질감염).

[0783] 예시적인 항체 클론 이외에도, (비교 목적을 위해) 다음의 항체도 사용하였다:

[0784] · E Biosciences 14-5949 항-인간 B7H4 마우스 IgG

[0785] · US biological B0000-35B 항 인간 B7H4 마우스 IgG

[0786] · *R and D systems* AF2514 항 마우스 B7H4 염소 IgG1

[0787] · *Sigma* SAB2500141 항 B7H4 염소 IgG1

[0788] · 이소형 1 CAT004 SP06-003

[0789] · 이소형 2 R 및 D 정상 염소 IgG 대조군(AB-108C)

[0790] 친화도 분석 KinExA 3200

[0791] E02_GL Fab: E02_GL Fab SEC 분획(33.4~34.5 min, 07031802.D),

- [0792] B7H4: hB7H4-ECD-Flag-His10(4.34 mg/mL-1, J Watson, 31/10/17).
- [0793] KinExA 완충액:
- [0794] 0.02% 아지드화나트륨(VWR/Merck 103692K, 로트: K35580906)이 첨가된 D-PBS, 1리터, 0.20 μm 멸균 여과됨.
- [0795] 0.02% 아지드화나트륨(VWR/Merck 103692K, 로트: K35580906) 및 1 mg mL⁻¹ 소 혈청 알부민(Sigma A-2058, 로트: 108H0573)이 첨가된 D-PBS. 1.0리터, 0.20 μm 멸균 여과됨.
- [0796] 2차 검출 시약:
- [0797] DyLight649 표지된 마우스 항-인간 H+L 사슬 2차 검출 시약Jackson ImmunoResearch, 209-495-088, 로트 9100 3)을 전체 IgG 또는 Fab 검출에 사용하였다. 800 μL Milli-Q 물로 재구성한 바이알(약 1 mg).
- [0798] r 인간 B7H4 ECD의 최소 아민 비오틀닐화:
- [0799] · 단백질: r 인간 B7H4 ECD-FlagHis10(4.34 mg mL⁻¹, 배치 1, 17년 10월 31일)
- [0800] · 공급원: JWPur006
- [0801] · 부피/완충액: 0.100 mL /PBS
- [0802] · 단백질 질량(Da): 29,053.57 Da
- [0803] · 비오틀닐화될 단백질의 질량 = 0.434 mg
- [0804] · 비오틀닐화할 단백질의 양(피코몰) 0.000434 g/29,054 Da = 1.494 E-8몰(14,938피코몰)
- [0805] 비오틀닐화:
- [0806] · D-PBS 중 포화 NaHCO₃ 10 μL 가 첨가됨.
- [0807] · 시약: EZ 링크 술포-NHS-LC-비오틀(Perbio/Pierce, 제품 번호 21335)(DMF 중 1.0 mg mL⁻¹).
- [0808] · 최초 펄스 단백질:비오틀 비: 1:0.5 14,938 x 0.5 = 14,938
- [0809] o 7,468/1,797 pmol μL^{-1} = 4.16 μL
- [0810] · 시작: 오후 16:07; 샘플링: 오후 16:35
- [0811] · 모두 Dulbecco의 PBS 평형화된 PD-10 컬럼에 적용되었다.
- [0812] 생체 내 이미징 연구
- [0813] 항체 클론(예를 들어, E02_GL)은 800CW(LI-COR Biosciences)로 표지되었다. 800CW 표지된 R347을 대조군 실험에 사용하였다.
- [0814] B7-H4 발현 CT26/4TI/HT29 암세포를 3~5일령의 누드 마우스(Charles River Laboratories, 미국 매사추세츠 주 윌밍턴 소재)의 왼쪽 옆구리에 이식하고(예를 들어, 피하 접종), B7-H4 비발현 CT26/4TI/HT29 암세포를 오른쪽 옆구리에 이식하여 내부 대조를 제공하였다. 종양이 발달하도록 마우스를 일주일 동안 유지시켰고, 800CW 표지된 E02_GL을 주사하였다. 800CW 표지된 R347을 대조군 마우스에 주사하였다. 종양의 생체 내 영상화는 표지된 항체의 주사 후 1, 3, 7 및 9일에 표지로부터 방사광을 이미징화하여 수행하였다.
- [0815] 실시예 1
- [0816] B7-H4는 다수의 세포 유형에서 과발현된다
- [0817] 면역조직화학은 다수의 종양 유형을 나타내는 인간 대상체로부터 취한 다수의 종양 절편으로부터의 절편에 대해 수행하였다(표 2에 개략적으로 설명됨). B7-H4의 발현은 유방암(예를 들어, 호르몬 수용체 양성(HR+)) 유방암과 비소세포 폐암종(NSCLC)에서 특히 두드러진 것으로 나타났다(도 1의 A 내지 D 참조). 흥미롭게도, 대부분의 종양은 이중 발현을 보여주었다.
- [0818] 치료 후 환자의 비율에서 발현이 유지되었다(여기서 HER2+ 유방암 환자는 허셉틴으로 치료받았고, 난소암 환자는 백금 기반 화학요법으로 치료받았다).

표 2.

종양 유형		% 양성 ¹	% 고 양성 ²	% 저 양성 ³	평가된 N
유방	HR+	85	23	51	39
	TNBC	70	32	23	230
	HER2+	87	42	28	98
	- 허셉틴 적격	83	43	20	30
	- 허셉틴 치료	88	41	31	68
난소(장액성)		72	24	33	71
자궁내막		84	35	48	39
NSCLC	편평	63	15	48	160
	선암종	19	2	15	143
췌장		31	1	18	90
위		10	0	10	21
담관암종		13	38	38	13

¹ 양성: 임의의 강도 및 빈도의 염색이 있는 종양

² 고 양성: 종양 세포의 >50%에서 강도가 >2+인 막 염색이 있는 종양

³ 저 양성: 종양 세포의 <50%에서 강도가 ≤2+인 막 염색이 있는 종양

조직 마이크로어레이 분석 기반 데이터

실시예 2

항-B7-H4 항체의 생성

VelocImmune II 마우스(Regeneron, 미국 뉴욕 주 태리타운 소재)를 다음과 같이 면역화한 반복 면역화 다중 부위(RIMS) 전략을 취하였다:

-4일: 채혈 전

0일: 프라임 면역화

7일: 제2 부스트

13일: 제1 채혈

15일: 제3 부스트

20일: 제2 채혈

22일: 제4 부스트

24일: 제5 부스트

28일: 마지막 채혈 및 비장 및 LN 융합

면역화를 위해, 16마리의 V2 마우스를 4개의 그룹으로 나누었고, 각 그룹은 4마리의 동물을 포함하였다. 동물을 인간 및 마우스 재조합 B7-H4 뿐만 아니라 SkBr3 세포(예를 들어, B7-H4를 발현함)로 면역화하였다. 면역원의 세부 사항은 아래 표 3에서 확인할 수 있다(TT = 파상풍 독소; DTA = 디프테리아 독소; KLH = 키홀 림펫 헤모시아닌).

표 3.

그룹 N=4	프라임	2	3	4	5
G1	KLH-mB7H4	KLH-hB7H4	KLH-mB7H4	KLH-hB7H4	KLH-hB7H4
G2	KLH-mB7H4	SkBr3	KLH-mB7H4	SkBr3	SkBr3
G3	mB7H4-TT	KLH-hB7H4	mB7H4-TT	KLH-hB7H4	mB7H4-TT
G4	mB7H4-DTA	KLH-hB7H4	mB7H4-DTA	KLH-hB7H4	mB7H4-DTA

하이브리도마 생성

10마리의 마우스로부터 림프구 세포를 수확하고, 3번 및 9번 마우스의 세포에 B 세포를 풍부하게 하고, 다른 8마리의 마우스로부터의 세포에 대해서는 선택을 수행하지 않았다. 림프구 세포와 Sp2/0 Ag14 골수종 세포를 5:1의 비로 혼합하고 무혈청 배지로 세척한 다음, PEG를 사용하여 수동으로 또는 테칸(tecان) 로봇으로 융합을 수행하였다. 융합 후, 세포를 완전 HM20 배지 200 ml에 재현탁시키고 100 μ l를 20개 플레이트의 컬럼 1~11에 첨가하였다. 3일 후 각 웰에 배지 100 μ l를 추가로 첨가하였다. 각 마우스에 대한 융합 세부 사항은 표 4에 제시되어 있다.

표 4.

마우스	군	비장 세포 $\times 10^6$	LN 세포 $\times 10^6$	전체 $\times 10^6$	LNC(%)	융합 유형	선택
1	1	57.72	13.78	71.50	19.27	테칸	없음
3	1	73.42	10.35	83.77	12.36	수동	B 세포
4	1	27.78	11.47	39.25	29.21	테칸	없음
5	2	67.92	23.45	91.37	25.66	테칸	없음
7	2	78.20	25.70	103.90	24.74	테칸	없음
9	3	62.47	11.98	74.45	16.09	수동	B 세포
10	3	53.43	5.25	58.68	8.95	수동	없음
11	3	50.80	9.25	60.05	15.40	테칸	없음
13	4	41.33	11.98	53.30	22.47	수동	없음
14	4	38.20	34.30	72.50	47.31	테칸	없음

하이브리도마 스크리닝 및 클로닝

융합 후 13일에 수확된 상층액을 하이브리도마 그룹에 의해 비드 기반 IgG/IgM 스크린에서, 그리고 인간, 시노물구스 및 마우스 B7H4 HTRF 생화학적 결합 분석에서, 그리고 HTS에 의한 SkBr3 FMAT 분석에서 스크리닝했다.

스크리닝 후 양성 히트를 선택하였고, 그 중 58개를 반고체 배지로 클로닝하였다. IgG 양성 클론을 ClonePix-FL을 사용하여 각 웰 라인에서 선택하였고, 이를 이후 1차 분석에서 스크리닝하였다. 그런 다음 각 웰 라인에서 최대 4개의 클론을 선택하여 성장시키고 소규모 IgG 정제를 수행하였다(Phytip- 단백질 A).

Phytip 물질의 생물학적 스크리닝 후, 추가 특성화를 위해 5개의 예비적인 항체를 선택했다(이의 세부 사항은 표 5에서 확인할 수 있음).

표 5.

클론 ID	마우스 ID	면역원
ZYOEPO-E02	5	그룹 2 (SkBr3 세포/mB7H4-KLH)
ZYOEQD-E02	7	그룹 2 (SkBr3 세포/mB7H4-KLH)
ZYOEPO-C07	4	그룹 1 (mB7H4-KLH/h-B7H4-KLH)
ZYEOEB-F05	1	그룹 1 (mB7H4-KLH/h-B7H4-KLH)
ZYOE05-E07	1	그룹 1 (mB7H4-KLH/h-B7H4-KLH)

- [0850] ZY0EPQ-E02(및 이의 생식세포화 버전, 예를 들어 약어 "GL"을 내포함)는 (각각) 서열번호 1~3의 CHDR1~3 및 (각각) 서열번호 4~6의 CLDR1~3을 포함한다. ZY0EPQ-E02는 서열번호 31의 VH 사슬과 서열번호 32의 VL을 포함한다.
- [0851] ZY0EQD-E02는 (각각) 서열번호 7~9의 CHDR1~3 및 (각각) 서열번호 10~12의 CLDR1~3을 포함한다. ZY0EQD-E02는 서열번호 33의 VH 사슬과 서열번호 34의 VL을 포함한다. ZY0EQD-E02의 생식세포화 버전은 나중에 예를 들어, 약어 "GL"의 포함에 의해 언급되고, 예를 들어, (서열번호 45의 VH 사슬 및 서열번호 34의 VL을 갖는) EQD-E02_GL로서 언급된다.
- [0852] ZY0EOB-F05는 (각각) 서열번호 13~15의 CHDR1~3 및 (각각) 서열번호 16~18의 CLDR1~3을 포함한다. ZY0EOB-F05는 서열번호 35의 VH 사슬과 서열번호 36의 VL을 포함한다.
- [0853] ZY0E05-E07는 (각각) 서열번호 19~21의 CHDR1~3 및 (각각) 서열번호 22~24의 CLDR1~3을 포함한다. ZY0E05-E07는 서열번호 37의 VH 사슬과 서열번호 38의 VL을 포함한다.
- [0854] ZY0EP0-C07는 (각각) 서열번호 25~27의 CHDR1~3 및 (각각) 서열번호 28~30의 CLDR1~3을 포함한다. ZY0EP0-C07는 서열번호 39의 VH 사슬과 서열번호 40의 VL을 포함한다.
- [0855] 이들 5개의 예시적인 항체를 인간 IgG1, 인간 IgG1-TM(삼중 돌연변이) 및 무린 IgG1 백본 상에 재구성하였다.
- [0856] 5개의 재구성된 예시적인 항체의 서열 분석은 ZY0EPQ-E02와 ZY0EQD-E02 뿐만 아니라 클론 ZY0EOB-F05와 ZY0E05-E07 사이의 동일성을 보여준다(도 28 참조).
- [0857] 실시예 3
- [0858] 선택된 클론을 이용한 항원 결합 분석
- [0859] 무린 IgG1, 인간 IgG1 및 인간 IgG1-TM과 같은 5개의 예시적인 항체의 농도-효과 결합은 HTRF 분석법을 통해 인간, 시노몰구스 및 무린 B7-H4-Fc를 사용하여 수행되었다. 무린 IgG1 항체의 경우, Dylight-649와 접합된 항-무린 IgG를 검출에 사용하였다. 유사한 분석 형식이 인간 IgG1 및 IgG1-TM 항체와 함께 사용되었다. 그러나 Dylight-649와 접합된 항-인간 카파를 검출에 사용하였다.
- [0860] 항체 ZY0EPQ-E02 및 ZY0EQD-E02는 인간 또는 시노몰구스 B7-H4-Fc보다 무린 B7-H4-Fc에 대한 더 높은 EC₅₀ 및 더 낮은 최대 결합을 가지며, 이는 무린 B7-H4에 대한 더 낮은 친화도를 나타낸다. 다른 모든 항체는 인간, 시노몰구스 및 무린 B7-H4-Fc에 대한 유사한 EC₅₀ 및 최대 결합을 갖는다(표 6~8 참조).
- [0861] 표 6. 인간 B7-H4-Fc를 사용한 HTRF 데이터

항체	인간 B7-H4-Fc					
	무린 IgG1		인간 IgG1		인간 IgG1-TM	
	EC50 (nM)	최대	EC50 (nM)	최대	EC50 (nM)	최대
ZY0EPQ-E02	0.38	2741	0.38	1127	0.41	1092
ZY0EQD-E02	0.22	3166	0.35	1237	0.33	1272
ZY0EOB-F05	0.30	3025	0.15	1816	0.15	1873
ZY0E05-E07	0.68	2150	0.19	1708	NT	NT
ZY0EP0-C07	0.95	1736	0.30	1221	0.31	1207

[0862]

[0863] 표 7. 시노몰구스 B7-H4-Fc를 사용한 HTRF 데이터

항체	시노 B7-H4-Fc					
	무린 IgG1		인간 IgG1		인간 IgG1-TM	
	EC50 (nM)	최대	EC50 (nM)	최대	EC50 (nM)	최대
ZY0EPQ-E02	0.38	2236	0.33	987	0.35	934
ZY0EQD-E02	0.22	2494	0.28	1127	0.28	1100
ZY0EOB-F05	0.32	2398	0.14	1483	0.15	1483
ZY0E05-E07	0.71	1698	0.18	1359	NT	NT
ZY0EP0-C07	1.28	1247	0.33	946	0.39	890

[0864]

[0865] 표 8. 무린 B7-H4-Fc를 사용한 HTRF 데이터

항체	무린 B7-H4-Fc					
	무린 IgG1		인간 IgG1		인간 IgG1-TM	
	EC50 (nM)	최대	EC50 (nM)	최대	EC50 (nM)	최대
ZY0EPQ-E02	2.03	790	1.49	279	1.76	256
ZY0EQD-E02	3.64	447	1.40	167	1.44	224
ZY0EOB-F05	0.38	2190	0.19	1319	0.19	1342
ZY0E05-E07	0.73	1697	0.21	1300	NT	NT
ZY0EPO-C07	0.49	1910	0.18	1321	0.20	1252

[0866]

[0867] 결합 친화도 측정

[0868] 인간, 무린 및 스플라이스 변이체 B7-H4 ECD에 대한 항체 친화도를 ForteBio Octet 시스템으로 측정했다. 인간 IgG1-TM 항체를 단백질 G에 의해 포획하였고 단량체 중 B7-H4-FLAG ECD는 항체에 대한 결합을 측정했다. 인간 B7-H4에 대한 친화도는 10~25 nM 범위인 반면, 무린 친화도는 10~600 nM 사이였다. ZY0EPO-C07을 제외한 모든 항체는 200~1600 nM 사이의 친화도로 스플라이스 변이체에 결합할 수 있다. 동역학 결합 매개변수는 아래 표 9에 요약되어 있다.

[0869] 표 9. 옥텟 친화도 요약

항체	단백질	hIgG1-TM (n=4~7)			hIgG1 (n=1)		
		KD (nM)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD (nM)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
ZY0EPQ-E02	인간 B7-H4	25.7	7.09E+04	1.82E-03	24	8.59E+04	2.08E-03
	무린 B7-H4	396	7.67E+04	3.04E-02	498	1.00E+05	4.98E-02
	B7-H4-SV	1660	1.38E+03	2.29E-03	1030	2.46E+03	2.52E-03
ZY0EQD-E02	인간 B7-H4	14.4	1.93E+05	2.78E-03	14.9	2.16E+05	3.21E-03
	무린 B7-H4	621	2.03E+05	1.26E-01	625	3.41E+05	2.13E-01
	B7-H4-SV	801	3.36E+03	2.69E-03	834	4.19E+03	3.49E-03
ZY0EOB-F05	인간 B7-H4	13.4	2.65E+04	3.55E-04	11.7	3.10E+04	3.62E-04
	무린 B7-H4	25	1.87E+04	4.76E-04	19.8	2.49E+04	4.93E-04
	B7-H4-SV	174	3.35E+03	5.84E-04	127	4.71E+03	5.98E-04
ZY0E05-E07	인간 B7-H4	19.8	1.71E+04	3.38E-04	14.6	2.17E+04	3.18E-04
	무린 B7-H4	30	1.21E+04	3.61E-04	23.2	1.79E+04	4.15E-04
	B7-H4-SV	264	1.89E+03	4.99E-04	182	2.91E+03	5.28E-04
ZY0EPO-C07	인간 B7-H4	9.4	4.16E+04	3.97E-04	7	4.88E+04	3.63E-04
	무린 B7-H4	11	4.30E+04	5.24E-04	9	6.02E+04	5.51E-04
	B7-H4-SV	결합 없음			결합 없음		

[0870]

[0871] 에피토프 비닝

[0872] 유로폼 접합된 항-FLAG 항체로 검출하여 단량체 B7-H4-FLAG ECD에 결합하는 DyLight-649와 접합된 예시적인 항체(IgG1-TM)를 사용하여 HTRF 분석 형식으로 에피토프 비닝을 수행하였다.

[0873] 빈 1은 서로 완전히 억제하는 ZY0EPQ-E02, ZY0EQD-E02 및 ZY0E05-E07 항체와 오로지 부분 억제하는 ZY0EPO-C07로 정의되었다. 빈 2는 모든 항체와 완전히 경쟁하는 ZY0EOB-F05 항체 및 그것과 완전히 경쟁하는 모든 항체로 정의되었다. 빈 3은 항체 ZY0EPQ-E02, ZY0EQD-E02 및 ZY0E05-E07(빈 1)과 부분적으로 경쟁하는 ZY0EPO-C07로 정의되었다.

[0874] 표 10. HTRF 에피토프 요약 표

경쟁 항체	Dy649 접합 항체				
	ZY0EPQ-E02	ZY0EQD-E02	ZY0EOB-F05	ZY0E05-E07	ZY0EPO-C07
ZY0EPQ-E02	완전	완전	완전	테스트하지 않음	부분
ZY0EQD-E02	완전	완전	완전		부분
ZY0EOB-F05	완전	완전	완전		완전
ZY0E05-E07	완전	완전	완전		부분
ZY0EPO-C07	부분	부분	완전		완전

[0875]

[0876] 중 교차 반응성 ELISA

[0877] 상기 언급된 5개의 VelocImmune 유래 항-B7-H4 예시 항체 각각을 사내 유래 뮤린 B7-H4(ECD)에 대한 결합에 대해 테스트하였다. 모든 예시적인 항체는 4/5 뮤린 IgG1과 함께 인간 IgG1-TM으로 테스트되었다(ZY0EP0-C07은 이 시점에서 뮤린 IgG1로 이용 가능하지 않았음). 단량체 및 이량체 뮤린 및 인간 B7-H4 변이체에 대한 결합을 비교하였다(각각 FlagHis10 또는 FcHis6 태그 부착됨).

[0878] 이소형에 관계없이 모든 IgG는 뮤린 및 인간 B7-H4 항원 둘 다에 대해 교차 반응성을 보유했다. FcHis6 태그 부착된 B7-H4 항원의 이량체 특성은 상응하는 단량체 FlagHis10 B7-H4 항원에 의해 제공된 곡선의 왼쪽으로 균일하게 이동된 결합 곡선을 생성했다. 이 효과는 뮤린 B7-H4에서 더 두드러졌다.

[0879] 임의의 VelocImmune 예시적 항체에서 무관한 항원 대조군에 대한 어떠한 유의한 결합도 관찰되지 않았다. 이소형 대조군 IgG는 B7-H4 항원(NIP228 - 인간 IgG1-TM 및 MOPC-21 - 뮤린 IgG1)에 비특이적으로 결합하지 않았다 - 도 2 참조.

[0880] 상업용 항-B7-H4 다클론 및 단클론 특이성 ELISA

[0881] 상업용 단클론 및 다클론 항혈청의 패널을 ELISA에 의해 인간 및 뮤린 B7-H4 항원에 대한 결합에 대해 테스트했다. 각각의 항혈청을 또한 절단된 인간 B7-H4 스플라이스 변이체(본질적으로 이의 세포외 IgV 도메인이 결여됨)에 대한 결합에 대해 테스트하였다. FlagHis10 또는 FcHis6 B7-H4 항원이 사용되었는지와 관계없이 동등한 데이터를 얻었다. 다양한 교차 반응성 프로파일이 표 11 및 12에 요약되어 있다.

[0882] 표 11. 단클론성

회사	카탈로그 번호	로트 번호	B7-H4		
			인간	뮤린	스플라이스 변이체
AdD serotec	<u>MCA2632</u>	707	Y	N	N
eBioscience	<u>14-5949</u>	E021763	Y	Y	Y
Epitomics	<u>2516-1</u>	YD-08-23-02	N	N	n/a
US Biologicals	<u>B0000-35B</u>	L10061519	Y	N	N
eBioscience	<u>145972-82</u>	E010563	Y	Y	Y
eBioscience	<u>145970-85</u>	E010556	N	N	n/a
R & D	<u>MAB2154</u>	WVP0107101	Y	Y	Y

[0883]

[0884] 표 12. 다클론성

회사	카탈로그 번호	로트 번호	B7-H4		
			인간	뮤린	스플라이스 변이체
Santa Cruz	<u>sc68872 (H108)</u>	L1008	Y	Y	n/a
Santa Cruz	<u>sc68254 (G-18)</u>	C1910	N	N	n/a
R & D	<u>AF2154</u>	WVP016011	Y	Y	Y
Abbiotec	<u>250473</u>	10051104	N	N	n/a
Sigma Aldrich	<u>SAB2500141</u>	7942P1	Y	Y	N

[0885]

[0886] B7-H4 상동체 특이성 ELISA

[0887] 5개의 선택된 클론(VelocImmune IgG) 각각을 B7-H4 패밀리 구성원 및 상동체(뮤린 IgG1 ZY0EP0-C07이 테스트에 이용 가능하였음)에 대한 비특이적 결합에 대해 테스트하였다. 인간 B7-H4의 ECD를 테스트 서열로 사용하여 BLASTP 검색을 수행함으로써 테스트할 항원의 선택이 안내되었다. 그런 다음 이 목록의 유리한 히트를 CLUSTALW 분석을 사용하여 정렬하고 1차 아미노산 수준에서 가장 높은 동일성 백분율을 나타내는 항원을 공급했다(표 13 참조).

[0888] 표 13.

동일성 백분율

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1		13.2	21.5	21.4	25.9	21.6	20.7	25.4	25.2	25.8	1	인간 B7-H4 ECD.pro
2	377.0		11.7	12.1	13.1	10.3	11.0	13.7	9.7	8.4	2	인간 MOG1.pro
3	229.0	426.0		19.2	27.8	21.5	20.1	18.2	18.1	13.8	3	인간 B7-H1.pro
4	229.0	414.0	255.0		21.2	20.8	17.7	21.4	18.2	13.4	4	인간 B7-H2.pro
5	190.5	377.0	174.9	231.0		25.6	19.5	23.4	24.1	20.1	5	인간 B7-H3.pro
6	228.0	498.0	229.0	236.0	192.5		42.3	45.8	34.8	15.0	6	인간 BTN1A1.pro
7	238.0	461.0	244.0	279.0	253.0	103.0		41.0	33.6	15.8	7	인간 BTN2A1.pro
8	194.4	362.0	270.0	229.0	209.0	91.9	107.6		32.5	17.5	8	인간 BTN3A2.pro
9	196.4	538.0	271.0	270.0	203.0	133.7	139.3	145.3		11.8	9	인간 BTNL3.pro
10	191.3	661.0	360.0	368.0	245.0	330.0	311.0	282.0	426.0		10	인간 HHLA2.pro
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

불
일
치

[0889]

[0890] 5개의 예시적인 항체는 항체 이소형에 관계없이 상동체 huB7-H1, huB7-H2, huB7-H3, huBTN1A1, huHHLA2 또는 huBTN3A2에 측정 가능하게 결합하지 않는다. huMOG1, huBTN2A1 또는 huBTNL3 항원을 테스트할 경우 결합이 보이지 않았다는 점에 유의한다(도 3 참조).

[0891] 온셀 웨스턴 결합 분석

[0892] 아큐타제를 사용하여 T175 플라스크에서 세포를 분리하고 계수했다. 사용된 형질감염 방법은 본질적으로 Invitrogen Lipofectamine LTX 프로토콜(역 형질감염 방법을 사용하는 고처리량 프로토콜)에 명시된 방법이었다. 100 μ l의 세포(100 μ l당 4.5×10^4)를 DNA-리포펙타민 믹스를 함유하는 96웰 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 18시간 동안 인큐베이션하고 10% 완충 포르말린을 사용하여 밤새 고정하였다. 플레이트를 Odyssey 차단 완충액으로 차단하고 적절한 1차 항체와 함께 밤새 인큐베이션한 다음, 적절한 Odyssey 2차 항체로 세척 및 검출하였다.

[0893] 플레이트를 공기 건조시키고 제조업체에서 제공한 권장 스캔 수준을 사용하여 Odyssey Imager를 사용하여 스캔했다.

[0894] QD-E02 및 PQ-E02는 높은 수준의 비특이적 결합을 나타내어, 이 항체들은 놀랍게도 대조군 항체(레인 E, U, R, S)에서 볼 수 있는 정도를 넘어서는 방식으로 광범위한 세포 유형에 결합한다 - 도 4 참조. OB-F05 및 O5-E07은 형질감염된 HEK로 우수한 결과를 제공하고 또한 형질감염된 CHO에 결합한다. 예시적인 항체 QD-E02, OB-F05 및 O5-E07 및 PQ-E02는 OVCAR4 세포에 결합한다.

[0895] 요약

[0896] 표 14는 5개의 예시적인 항체의 특성을 요약하여 보여준다.

[0897] 표 14.

항체	단백질	Octet KD (nM)	에피토폭	ZAP		
ZYOEPO-E02	인간 B7-H4	26	1	세포	IC50 (M)	생존율(%)
	뮤린 B7-H4	396		SKBR3	4.E-09	65
	B7-H4-SV	1660		OVCAR4	2.E-08	46
ZYOEQD-E02	인간 B7-H4	14	1	세포	IC50 (M)	생존율(%)
	뮤린 B7-H4	621		SKBR3	1.E-08	48
	B7-H4-SV	801		OVCAR4	2.E-08	40
ZYOE0B-F05	인간 B7-H4	13	2	세포	IC50 (M)	생존율(%)
	뮤린 B7-H4	25		SKBR3	4.E-18	84
	B7-H4-SV	174		OVCAR4	3.E-17	67
ZYOE05-E07	인간 B7-H4	20	1	세포	IC50 (M)	생존율(%)
	뮤린 B7-H4	30		SKBR3	2.E-16	79
	B7-H4-SV	264		OVCAR4	7.E-17	58
ZYOEPO-C07	인간 B7-H4	9	3	세포	IC50 (M)	생존율(%)
	뮤린 B7-H4	11		SKBR3	4.E-09	72
	B7-H4-SV	결합 없음		OVCAR4	1.E-08	57

[0898]

[0899] 실시예 4

[0900] 유동 세포분석법에 의한 B7-H4 표면 발현에 대한 세포주 스크리닝

[0901] 다음의 인간 세포주는 예시적인 항체 및/또는 상업용 항-B7-H4 항체를 사용하여 B7-H4 발현에 대해 양성으로 테스트되었다(상대적인 B7-H4 발현 수준이 '+'로 표시됨):

[0902] - SK-BR-3 (+++)

[0903] - T47D (+)

[0904] - MDA-MB-468 (++)

[0905] - OVCAR4 (+++)

[0906] - NIH:OVCAR3 (+)

[0907] - Calu-3 (+)

[0908] 다음의 인간 세포주는 음성으로 테스트되었다: NCI-H322, Raji(+/- IFNg 활성화), Ramos(+/- IFNg 활성화) 및 Du145.

[0909] 실시예 5

[0910] 시험관 내 세포독성 분석

[0911] B7-H4 발현 세포주에 의한 5개의 인간 IgG1-TM 예시적 항체의 내재화가 실험적으로 확인되었다(SK-BR-3, MDA-MB-468, OVCAR4 및 JumpIn CHO F1-B7H4). ADC 세포독성은 사포린 접합된 항-인간 IgG 2차 항체를 사용하여 5개의 IgG1-TM 예시적 항체에 대해 입증되었다(도 5 참조). 20 µg/ml의 '항체 단독' 대조군에서 세포 생존율은 약 100%였다.

[0912] 실시예 6

[0913] 클론 ZYOEQD-E02 특이성 ELISA

[0914] 클론 ZYOEQD-E02의 우수한 성능으로 인해, 이 클론을 더 자세한 분석을 위해 선택하였다. ZYOEQD-E02는 서열번호 7의 CHDR1; 서열번호 8의 CHDR2; 서열번호 9의 CHDR3; 서열번호 10의 CLDR1; 서열번호 11의 CLDR1; 서열번호 12의 CLDR1을 포함한다. 상기 클론은 서열번호 33의 VH 사슬 및 서열번호 34의 VL 사슬을 포함한다. 상기 클론은 서열번호 48의 중쇄 및 서열번호 44의 경쇄를 포함한다. 생식세포화 버전(E02-GL)은 서열번호 45의 VH 사슬 및 서열번호 34의 VL 사슬을 포함하고; 예를 들어 서열번호 51의 중쇄 및 서열번호 44의 경쇄를 포함한다.

[0915] 인간(스플라이스 변이체 포함), 시노몰구스 마카크(cyno), 마우스 및 랫트로부터의 B7-H4에 대한 결합을 결정하

기 위해 ELISA 분석을 수행하였다. 상기 종에서 인간 B7-H4의 서열 동일성 백분율은 다음과 같다: 도메인 FL - 시노물구스 마카크(98.6%); 토끼(91.6%); 마우스(87.9%); 랫트(86.9%); 도메인 ECD - 시노물구스 마카크(99.6%); 토끼(94.3%); 마우스(90%); 랫트(89.6%).

- [0916] 클론의 Maia 형식 mAb(예를 들어, 서열번호 41에 제시된 바와 같은, 예를 들어, C 삼입부를 포함함)를 결합에 대해 테스트하였다. 야생형뿐만 아니라 다수의 변이체(생식세포화(GL), GLQ, GLY)가 대조군으로서 R347-maia 인간 IgG1과 함께 분석되었다(도 6 참조).
- [0917] R347-maia 이소형 대조군은 테스트한 어떤 항원에도 결합하지 않는 것으로 나타났다. E02-maia 결합 프로파일은 이전 실험과 유사하다. E02-maia 및 E02-GL-maia는 유사한 결합 프로파일을 갖는다. 유리하게는, 이는 항체의 생식세포화(GL) 및 비생식세포화(예를 들어, WT) 버전 모두가 항체의 유리한 결합 특성/프로파일을 유지한다는 것을 입증한다.
- [0918] 실시예 7
- [0919] mAb "1D11"에 대한 E02-GL 결합의 비교
- [0920] 클론 ZY0EQD_E02, 생식세포화(여기서는 E02-GL로 지칭됨) 결합 친화도를 ELISA에 의해 공지된 항-B7-H4 항체 "1D11"(Genentech; 본원에 참조로 포함되는 WO 2016040724에 기재됨)의 결합 친화도와 직접 비교하였다(위의 재료 및 방법 참조).
- [0921] "E02-GL" 항체는 ZY0EQD-E02의 CDR 서열(예를 들어 이에 상응함)을 갖는다("GL"은 항체가 생식세포화되었음을 의미함). 예를 들어, 이 예에서 E02-GL은 서열번호 45의 VH 사슬 서열, 예를 들어 서열번호 43의 생식세포화 버전을 포함한다.
- [0922] 직접 비교는 클론 E02-GL이 1D11보다 상당히 우수한 결합(친화도)을 나타냄을 입증한다(도 7 참조). 실시예 7과 일관되게, R347-maia 이소형 대조군은 테스트한 어떤 항원에도 결합하지 않는 것으로 나타났다.
- [0923] 또한, E02-GL은 (유동 세포분석법 실험을 통해) 1D11과 비교할 때 암세포에서 발현된 B7-H4에 대한 우수한 결합을 갖는 것으로 나타났다(상기 재료 및 방법 참조). 따라서, E02-GL은 우수한 결합을 나타낼 뿐만 아니라 암세포의 우수한 표적화도 보여준다. hB7-H4 발현 HT29 세포 및 SK-BR-3 세포(B7-H4를 발현함) 둘 다에 대한 결합을 테스트하였다. 31 ng/ml, 156 ng/ml 및 78 ng/ml의 농도에서 항체 결합을 테스트하였다. HT29 세포에 대한 결과는 도 8a에 제시되어 있고, SK-BR-3 세포에 대한 결과는 도 8b에 제시되어 있다. 기호 ◇는 'E02-GL 분획'을 나타내고 기호 □는 '1D11 분획'을 나타낸다. 기호 "●"는 (음성) 대조군 'R347 분획'을 나타낸다.
- [0924] 도 8a 및 8b에서 볼 수 있는 바와 같이, 'E02-GL 분획'의 세포 염색 세포 수는 '1D11 분획'의 염색 세포 수보다 유의하게 높았다.
- [0925] 실시예 8
- [0926] B7-H4 형질감염 유무에 따른 Ad293 세포의 시험관 내 세포독성(E02-GL-SG3932)
- [0927] 클론 E02-GL을 8의 평균 약물 항체 비율(DAR)로 토포이소머라제 I 페이로드 SG3932에 접합시켰고(E02-GL-SG3932 제공), 인간 B7-H4 형질감염된 Ad293 세포 및 형질감염되지 않은 Ad293 세포(예를 들어, 후자는 음성 대조군을 나타냄)를 표적화하고 사멸시키는 능력에 대해 테스트하였다. SG3932에 접합된 항체 NIP228을 대조군으로 사용하였다. 형질감염된 세포는 IC50이 53.3 ng/ml인 E02-GL-SG3932 접합체에 의해 쉽게 표적화되고 사멸되었다(도 9의 A 참조). 형질감염되지 않은 세포에서 E02-GL-SG3932 접합체의 첨가 후 유의한 사멸은 관찰되지 않았다(도 9의 B 참조). 토포이소머라제 억제제에 접합된 E02-GL을 포함하는 본원에 기재된 모든 실험에서, 사용된 E02-GL 클론은 전형적으로 서열번호 51의 중쇄 서열을 가졌다.
- [0928] 방법:
- [0929] TrypLE Express(Gibco, 영국 페이즐리 소재)에 의해 조직 배양 플라스크로부터 세포주를 분리하고, 원심분리에 의해 펠릿화하고, 성장 배지(RPMI-1640, 10% FBS)에 재현탁시켰다. Vi-CELL XR 세포 생존율 분석기(Beckman Coulter Life Sciences, 미국 인디애나 주 인디애나폴리스 소재)를 사용하여 트리판 블루 배제로 생존 세포를 계수했다. 세포 밀도를 성장 배지에서 3.33×10^4 개 세포/mL까지 조정하였다. 75 μ L/웰의 세포 현탁액(2.5×10^3 개 세포)을 96-웰 백색 웰의 투명 바닥 조직 배양 처리 플레이트에 첨가하고 가습 조직 배양 인큐베이터에서 37 °C, 5% CO₂에서 밤새 배양하였다.

- [0930] ADC(예를 들어, NIP228-SG3932 및 E02-GL-SG3932)를 240 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 성장 배지(RPMI-1640, 10% FBS)에 희석했다. 성장 배지(RPMI-1640, 10% FBS)에서 5배 연속 희석액을 제조한 다음, 25 μL 를 항체(예를 들어, NIP228-SG3932 또는 E02-GL-SG3932)의 9점, 5배 연속 희석액과 함께 배양된 세포의 3회 반복 웰에 첨가했다. 25 μL /웰의 성장 배지(RPMI-1640, 10% FBS)를 모의 처리된 대조군 세포에 첨가하였다. 세포를 6일 동안 5% CO_2 의 37°C에서 가습 조직 배양 인큐베이터에서 배양하였고, 이 기간에 제조업체의 프로토콜에 따라 CellTiter-Glo® 분석법(Promega, 영국 사우샘프턴 소재)을 사용하여 세포 생존율을 평가하였다. 발광을 Envision 멀티라벨 플레이트 판독기(Perkin Elmer, 영국 시어그린 소재)를 사용하여 측정하였다. GraphPad Prism, 버전 8(GraphPad Software, 미국 캘리포니아 주 라호이아 소재)에서 비선형 회귀 모델[로그 효능제 vs. 반응 - 가변 기울기(4개의 매개변수)]을 사용하여 절반 최대 억제 농도(IC50) 값을 생성하여 테스트 품목 항체(예를 들어, NIP228-SG3932 또는 E02-GL-SG3932)에 대한 효능을 결정하고 모의 처리된 대조군 세포에 대한 세포 생존율 백분율로 제시하였다 - $\left(\frac{[(\text{처리된 세포} - \text{배경})]}{(\text{모의 처리된 대조군 세포} - \text{배경})} \right) \times 100$).
- [0931] 실시예 9
- [0932] E02-GL-SG3932는 시험관 내에서 종양 세포의 방관자 사멸을 초래한다
- [0933] 개별적으로 플레이팅하거나 1:1의 비로 혼합하고 1일 동안 배양한 HT29-huB7-H4 클론 26 표적 양성 및 GFP 표지된 HT29 표적 음성 세포를 6일 동안 200 ng/mL의 E02-GL-SG3932 또는 NIP228-SG3932 이소형 대조군 ADC로 처리하였다. 처리 종료 시, 생 GFP 음성 HT29-huB7-H4 클론 26 세포 또는 GFP 양성 HT29 세포의 수를 유동 세포분석법을 사용하여 결정하였다. 결과는 도 10에 제시되어 있다: A) 점 도표는 단독으로 또는 함께 배양된 HT29-GFP 및 HT29+huB7-H4 클론 26 세포의 배지 처리된 샘플에 대한 처리 종료 시 유동 세포분석법 분석으로부터의 대표적인 이미지를 보여준다. 상단 좌측 및 하단 좌측 사분면에 제시된 숫자는 각각 HT29-GFP 및 HT29+huB7-H4 클론 26 세포의 백분율을 반영한다. B) 개별적으로 플레이팅된 경우, HT29+huB7H4 클론 26 세포에서 E02-GL-SG3932 처리 후 세포 수의 감소가 관찰되었는데, 이는 표적 음성 HT29-GFP 세포에서는 관찰되지 않았다. 세포가 공동 배양에서 플레이팅되었을 때, 표적 음성 HT29-GFP 및 표적 양성 HT29+huB7H4 클론 26 세포에 대한 세포 수가 감소되어 방관자 사멸 효과를 입증했다.
- [0934] 방법:
- [0935] 녹색 형광 단백질(GFP)을 안정적으로 발현하는 HT29-GFP 세포주를 제조하기 위해 렌티바이러스 발현 시스템을 사용하였다. 세포를 24-웰 플레이트에 웰당 총 세포 밀도 15,000개 세포로 플레이팅하고, 개별적으로 배양하거나 1:1의 비로 혼합하여 1일 동안 배양하였다. 그런 다음 배지를 제거하고 신선한 배지 단독 또는 200 ng/mL의 NIP228-SG3932 또는 E02-GL-SG3932 ADC를 함유하는 배지로 교체하고 세포를 추가로 6일 동안 인큐베이션하였다. 처리 종료 시, 생 GFP 음성 HT29+huB7-H4 클론 26 세포 또는 GFP 양성 HT29 세포의 수를 유동 세포분석법 및 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 결정하였다.
- [0936] 실시예 10
- [0937] E02-GL-SG3932는 생체 내에서 종양 세포의 방관자 사멸을 초래한다
- [0938] 종양 세포를 8 내지 10주령의 암컷 SCID 마우스에 피하 이식하였다. 종양이 적절한 종양 부피 범위(일반적으로 150~250 mm^3)에 도달하면 동물을 치료군과 대조군으로 무작위화하고 투약을 개시하였다. 종양 보유 마우스에게 정맥 주사를 통해 단일 용량의 테스트 품목을 투여했다. 동물을 매일 관찰하고 종양 크기와 체중을 매주 2~3회 측정하고 기록했다. 결과는 도 11에 제시되어 있다. 캘리포로 종양 부피를 측정하였고, 종양의 부피를 다음 식을 이용하여 계산하였다: 종양 부피 = 길이(mm) x 너비(mm)²/2, 여기서 길이와 너비는 각각 종양의 최장 직경과 최단 직경임.
- [0939] 실시예 11
- [0940] E02-GL-SG3932는 환자 유래 이종이식편(PDX) 모델에서 강력한 생체 내 활성을 갖는다
- [0941]
- [0942] 종양 조직 단편을 6 내지 8주령의 암컷 무흉선 누드 마우스에 피하 이식하였다. 종양이 적절한 종양 부피 범위(일반적으로 150~300 mm^3)에 도달하면 동물을 치료군과 대조군으로 무작위화하고 투약을 개시하였다. 종양 보유 마우스에게 정맥 주사를 통해 단일 용량의 테스트 품목을 투여했다. 동물을 매일 관찰하고 종양 치수 및 체중을

매주 2회 측정하고 기록하였다. 결과는 도 12에 제시되어 있고, E02-GL-SG3932가 환자 유래 이중이식편(PDX) 모델에서 강력한 생체 내 활성을 가짐을 입증한다. 디지털 캘리퍼로 종양 부피를 측정하였고, 종양의 부피를 다음 식을 이용하여 계산하였다: 종양 부피 = [길이(mm) x 너비(mm)² x 0.52, 여기서 길이와 너비는 각각 종양의 최장 직경과 최단 직경임.

[0943] 도 13은 처리 후 종양 부피 변화를 결정함으로써 E02-GL-SG3932에 대한 생체 내 항종양 반응을 추가로 평가한 결과를 보여주며, 단일 i.v. 주사 후 PDX 모델에서 E02-GL-SG3932의 항종양 활성을 다시 입증한다. 치료 시작 시 종양 부피는 초기 종양 부피(ITV)로 지칭된다. ADC 치료에 대해 최대 반응을 보이는 시점의 종양 부피는 최종 종양 부피(ETV)로 지칭된다. ETV가 ITV보다 작은 경우, 항종양 반응은 다음과 같이 계산된다: [(ETV-ITV)/ITV] x 100. 그렇지 않으면, 항종양 반응은 비히클 대조군 아암에 대한 처리 아암에서의 종양 부피 변화 백분율로 표현된다: 100-[1-((ETV-ITV)처리/(ETV-ITV)비히클) x 100].

[0944] 실시예 12

[0945] 시험관 내 MX-1 세포 및 HT29 유래 모델에서 및 생체 내 MX-1 모델에서 E02-GL-topo I 억제제 ADC는 유사한 효능을 갖는다

[0946] MX-1 이중이식편 모델은 Crown Biosciences(중국 타이창 소재)에서 수행되었다. 이 연구는 CRO 및 AstraZeneca IACUC 지침에 따라 수행되었다. MX-1 종양 세포는 공기 중 5% CO₂의 분위기에서 37°C에서 10% 태아 소 혈청이 보충된 RPMI-1640 배지에서 시험관 내에서 유지되었다. 기하급수적으로 성장하는 세포를 수확하고 암컷 BALB/c 누드 마우스의 오른쪽 옆구리에 5×10⁶개 세포(0.1 ml 부피의 PBS:마트리젤=1:1 중)를 이식했다. 치료 시작 직전에 마우스를 "일치 분포" 무작위화 방법(Study DirectorTM 소프트웨어)을 사용하여 치료군(평균 종양 부피 = 153 mm³)으로 무작위화하였다. 모든 항체-약물 접합체를 투여 직전에 완충액(25 mM 히스티딘, 7% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0)에 희석하였다. ADC를 단일 i.v. 용량으로 투여하였다. 종양 및 체중 측정을 일주일에 2회 기록하고 종양 부피를 식 길이(mm) x 너비(mm)²/2를 사용하여 계산하였다. 이환율 및 사망률에 대해 동물을 매일 모니터링하였다. 결과는 도 14a에 제시되어 있다.

[0947] HT29+huB7-H4 (클론 4)

[0948] HT29+huB7-H4 클론 4 세포주는 공기 중 5% CO₂ 분위기에서 37°C에서 10% 태아 소 혈청이 보충된 McCoy 변형 5A 배지에서 시험관 내에서 유지되었다. 기하급수적으로 성장하는 HT29+B7-H4 클론 4 세포를 수확하고 5×10⁶개 세포(0.2 ml 부피의 PBS:Cultrex=1:1 중)를 암컷 CB-17 SCID 마우스의 오른쪽 옆구리에 이식했다. 마우스를 "결정론적" 무작위화 방법(Study DirectorTM 소프트웨어)을 사용하여 치료 직전에 치료군으로 무작위화하였다(평균 종양 부피 = 250 mm³). 모든 항체-약물 접합체를 투여 직전에 완충액(25 mM 히스티딘, 7% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0)에 희석하였다. ADC를 단일 용량으로 i.v. 투여하였다. 종양 및 체중 측정을 일주일에 2회 기록하고 종양 부피를 식 길이(mm) x 너비(mm)²/2를 사용하여 계산하였다. 이환율 및 사망률에 대해 동물을 매일 모니터링하였다. 결과는 도 14b에 제시되어 있다.

[0949] 실시예 13

[0950] cyno B7-H4 형질감염된 세포의 시험관 내 세포독성(E02-GL-SG3249)

[0951] 클론 E02-GL을 세포독소 SG3249에 접합시켰고(E02-GL-SG3249 제공), 시노물구스 B7-H4 형질감염된 B7-H4 세포 및 형질감염되지 않은 B7-H4 세포를 표적화하고 사멸시키는 능력에 대해 테스트하였다. 편의상, Maia 중쇄 백본(예를 들어, SG3249가 접합할 수 있는 추가 부위를 제공하는 시스템인 삽입부를 가짐, 서열번호 48 참조)을 포함한 본 실시예에서 테스트한 항체를 사용하였다. 다른 중쇄 백본(예를 들어, 이러한 시스템인 삽입부가 결여됨, 예를 들어 서열번호 52 참조)이 사용되는 경우 효능 손실은 발생하지 않는다. SG3249에 접합된 항체 R347을 대조군으로 사용하였다.

[0952] "E02-GL" 항체는 ZY0EQD-E02의 CDR 서열(예를 들어 이에 상응함)을 갖는다("GL"은 항체가 생식세포화되었음을 의미함). 예를 들어, 이 예에서 E02-GL은 서열번호 45의 VH 사슬 서열, 예를 들어 서열번호 43의 생식세포화 버전을 포함한다.

[0953] 형질감염된 세포는 IC50이 0.6721 ng/ml인 E02-GL-SG3249 접합체에 의해 쉽게 표적화되고 사멸되었다. 형질감염

되지 않은 세포에서 E02-GL-SG3249 접합체의 첨가 후 유의한 사멸은 관찰되지 않았다(도 15 참조).

- [0954] 실시예 14
- [0955] E02-GL 작용 방식
- [0956] 생세포에서 E02-GL의 내재화 동역학 모니터링
- [0957] 형광 마커 AF647에 접합된 E02-GL을 사용하여 생세포를 처리했다. 처리 후 0분에 형광 클러스터가 세포막에서 눈에 띄었다(막에 존재하는 B7-H4에 대한 결합을 나타냄). 시간 경과 분석에 따르면 세포 내 형광 반점의 수가 시간이 지남에 따라 꾸준히 증가하여 수용체 항원과 함께 항체의 내재화를 나타내었다. Lamp1-AF488(리소좀의 마커)과의 공동 시각화는 상당한 중첩을 보여주어, 결합된 항체가 세포내이입에 의해 내재화됨을 나타내었다(도 16의 A 내지 C 참조).
- [0958] 표적 항원과의 결합 시 관찰된 항체의 내재화는 일반적으로 원하는 ADC 효과를 달성하기 위한 전제 조건으로 간주되기 때문에 매우 유리하다.
- [0959] "E02-GL" 항체는 ZY0EQD-E02의 CDR 서열(예를 들어 이에 상응함)을 갖는다("GL"은 항체가 생식세포화되었음을 의미함). 예를 들어, 이 예에서 E02-GL은 서열번호 45의 VH 사슬 서열, 예를 들어 서열번호 43의 생식세포화 버전을 포함한다.
- [0960] E02-GL-SG3932 ADC: 작용 기전
- [0961] HT29+huB7-H4 클론26 세포를 NIP228, E02-GL, NIP228-SG3932, E02-GL-SG3932, 또는 대조군으로서 warhead SG3924로 처리한 후(mAb 또는 ADC의 경우 10 ug/ml, warhead의 경우 10 nM), 용해물을 제조하고, pATR, ATR, pChk1, Chk1, pATM, ATM, pChk2, Chk2, pH2AX, H2AX 및 액틴(로딩 대조군)에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다 - 도 17a 참조. 결과는 E02-GL-SG3932의 토포이소머라제 I 독 warhead(SG3924)가 ATM 및 ATR 신호전달을 활성화하는 것을 입증하여, E02-GL-SG3932 처리가 시험관 내에서 이중 가닥 DNA 절단을 초래함을 나타낸다.
- [0962] MX-1 세포를 NIP228, E02-GL, NIP228-SG3932, E02-GL-SG3932, 또는 대조군으로서 warhead SG3924로 처리한 후(mAb 또는 ADC의 경우 10 ug/ml, warhead의 경우 10 nM), 용해물을 제조하고, pATR, ATR, pATM, ATM, pH2AX, H2AX 및 액틴(로딩 대조군)에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다 - 도 17b 참조. 결과는 E02-GL-SG3932의 토포이소머라제 I 독 warhead(SG3924)가 ATM 및 ATR 신호전달을 활성화하는 것을 입증하여, E02-GL-SG3932 처리가 시험관 내에서 이중 가닥 DNA 절단을 초래함을 나타낸다.
- [0963] 방법:
- [0964] HT29+huB7-H4 클론 26 및 MX-1 세포를 10% 열-불활성화 FBS를 함유하는 배지에서 각각 웰당 500,000 및 1,500,000개 세포의 밀도로 6-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 다음날, 플레이팅 배지를 제거하고 세포를 10 μ g/mL의 농도의 완전 배지 중 NIP228, E02-GL, NIP228-SG3932 및 E02-GL-SG3932와 함께 HT29+huB7-H4 클론26 세포와 인큐베이션하였다. warhead SG3924는 대조군으로 10 nM로 사용하였다. 72시간 후, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 1회 세척한 다음 Laemmli 환원 완충액(로딩 완충액 Boston BioProducts)을 첨가하여 용해시켰다. 짧은 인큐베이션 후, 세포 용해물을 수집하고 동일한 양을 Bis NuPAGE Novex 비스-트리스 겔(Invitrogen)에 로딩하고 단백질을 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 막(Invitrogen)으로 옮겼다. 막을 트리스 완충 식염수 pH 7.4(TBST)에서 5% 무지방 분유와 0.1% Tween 20(Sigma)으로 차단하고, Cell Signaling으로부터 pATM-Ser1981(#4526), ATM(#2873), pATR-Thr1989(#58014), ATR(#13934), pChk1-Ser345(#2348), Chk1(#2360), pChk2-Thr68(#2197), Chk2(#3440), pH2AX-Ser139(#2577) 및 H2AX(#2595)에 대한 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 액틴에 대한 항체(A1978, Sigma)를 사용하여 동일한 양의 단백질이 모든 웰에 로딩되도록 하였다. 막을 TBS 중 0.1% Tween 20으로 세척한 다음 양고추냉이 과산화효소(HRP) 접합된 스트렙타비딘 2차 항체(GE Healthcare)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후 SuperSignal West Femto 화학발광 기질과 SuperSignal West Pico 화학발광 기질(Pierce/Thermo Scientific)을 사용하여 단백질 밴드를 검출하였다. ImageQuant LAS4000 기기(GE Healthcare)를 사용하여 이미지를 캡처하고 분석했다.
- [0965] E02-GL-SG3249 ADC: 작용 기전
- [0966] E02-GL-SG3249 및 대조군으로서 SG3199(각각 100 ng/ml 및 100 pM)로 HCC1569 세포를 처리한 후, 용해물을 제조하고 pATR, ATR, pChk1, Chk1, pRPA32, RPA32, pATM, ATM(모두 ATR 신호전달에 관여), pChk2, Chk2, pKAP1,

KAP1(모두 ATM 신호전달에 관여), pDNA-PK, DNA-PK, pH2AX, H2AX, pBRCA1, BRCA1(모두 DNA 이중 가닥 절단에 관여), pFANCD2 및 GAPDH(로드 대조군)에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 음성 대조군은 PBS 처리 단독이었다.

[0967] 결과는 E02-GL-SG3249의 PBD 이량체 warhead(SG3199)가 ATM 및 ATR 신호전달을 활성화하는 것을 입증하여, E02-GL-SG3249 처리가 시험관 내에서 이중 가닥 DNA 절단을 초래함을 나타낸다(도 17c 참조).

[0968] 카스파제 3/7 활성

[0969] SKBR-3 세포를 E02-GL-SG3249, SG3199 및 올라파립(대조군)으로 처리하고 IncuCyte에서 카스파제 3/7 활성(예를 들어, 세포자멸사)을 모니터링했다. 카스파제 3/7 활성 수준의 용량 의존적 증가가 관찰되었다(도 18 참조).

[0970] 실시예 15

[0971] 종양 세포에 대한 E02-GL-SG3249 및 Warhead SG3199의 시험관 내 활성

[0972] 다수의 암 세포주를 표 15에 개략적으로 설명된 바와 같이 클론 E02-GL-SG3249(예를 들어, 세포독소에 접합됨)로 처리하였다. 결과는 도 19에 제시되어 있다.

[0973] 표 15.

세포주	설명	E02-GL MESF
HT29	B7-H4 음성	2,101
HT29 hB7H4 클론 4		71,928
HT29 hB7H4 클론 44		147,125
HT29 hB7H4 클론 26		429398
HEK293 JI 모체	B7-H4 음성	3266
HEK 293 JI hB7H4 풀	풀에 일부 음성 세포가 있음	2,481,266
HCC1954		47173
SKBr3		78343
Zr75-1		80699
HCC1569		112608
MDA-MB-468		92157
OVCAR4		261997

[0974] 실시예 16

[0975] E02-GL-SG3249는 시험관 내에서 종양 세포의 방관자 사멸을 초래한다

[0976] HT29 B7-H4 발현 세포를 E02-GL-SG3249로 4일 동안 처리한 후, 조정 배지를 제거하고 HT29 WT(즉, B7-H4를 발현하지 않음)에 첨가하였다. 조정 배지를 첨가한 후 세포 생존율의 급격한 감소가 관찰되었는데, 이는 처리되지 않은 대조군에서는 관찰되지 않았다(도 20 참조).

[0977] "E02-GL" 항체는 ZY0EQD-E02의 CDR/VH 서열(예를 들어 이에 상응함)을 갖는다("GL"은 항체가 생식세포화되었음을 의미함).

[0978] 실시예 17

[0979] E02-GL-SG3249는 종양 이중이식편의 성장을 억제한다

[0980] 다음의 암 세포주를 사용하여 마우스에서 종양 이중이식편을 제조하였다:

[0981] - OVCAR4(시스플라틴 불응성 난소암; 높은 B7-H4 발현)

[0982] - HCC1569(HER2 양성 유방암; 이중 B7-H4 발현)

[0983] - MDA-MB-468(삼중 음성 유방암; 낮은 B7-H4 발현)

[0984] "E02-GL" 항체는 ZY0EQD-E02의 CDR/VH 서열(예를 들어 이에 상응함)을 갖는다("GL"은 항체가 생식세포화되었음을 의미함).

[0985] 대조군(비히클 단독)과 비교하여 종양 부피의 유의한 감소가 관찰되었는데, 이는 놀랍게도 낮은 수준의 B7-H4 발현 TNBC 종양의 경우에도 마찬가지였으며(도 22 참조), 이는 종양 성장을 억제하는 데 있어서 E02-GL-SG3249의 높은 효능을 나타낸다.

- [0987] 실시예 18
- [0988] E02-GL-SG3249는 생체 내에서 종양 세포의 방관자 사멸을 초래한다
- [0989] B7-H4 이중 종양을 B7-H4 발현 HT29 세포주를 비발현 HT29 세포와 함께(1:1 비) 이식하여 생성하였다. 이러한 이중이식편의 이중 특성은 E02-GL-SG3249에 의한 성장 억제를 막지 못했으며, 이는 명백했다(도 23 참조). 본 발명자들이 B7-H4가 종양 내에서 이중으로 발현됨을 발견했기 때문에 이는 매우 유리하다.
- [0990] 실시예 19
- [0991] E02-GL ADC는 "1D11"과 비교하여 B7-H4 발현 세포의 우수한 시험관 내 세포독성을 갖는다
- [0992] 클론 E02-GL(ZYOEQD-E02-생식세포화(GL))을 세포독소 SG3249(E02-GL-SG3249 ADC 제공) 또는 AZ1508(E02-GL-AZ1508 제공)에 접합시키고, B7-H4 발현 세포를 표적화하고 사멸시키는 능력에 대해 Genentech "1D11" ADC((A114C-) MMAE에 접합된 1D11)와 비교하였다.
- [0993] "E02-GL" 항체는 ZYOEQD-E02의 CDR/VH 서열(예를 들어 이에 상응함)을 갖는다("GL"은 항체가 생식세포화되었음을 의미함).
- [0994] 세포독성 분석법(위의 재료 및 방법 참조)은 E02-GL ADC(E02-GL-SG3249)가 1D11 ADC((A114C-) MMAE에 접합된 1D11)와 비교할 때 우수한 세포독성 효능을 가짐을 입증했다 - 도 21 참조.
- [0995] ADC 역가 측정은 다음과 같았다:

1D11-A114C-MMAE	100µg/ml	25 µg/ml	6.25 µg/ml	1.56 µg/ml	390 ng/ml	98 ng/ml	24.5 ng/ml	6.12 ng/ml	1.53 ng/ml	382 pg/ml
E02-maia-GL-SG3249	4 µg/ml	1 µg/ml	250 ng/ml	65 ng/ml	16 ng/ml	4 ng/ml	1 ng/ml	250 pg/ml	62.5 pg/ml	16 pg/ml

- [0996]
- [0997] 실시예 20
- [0998] E02-GL-SG3249는 환자 유래 이중이식편(PDX) 모델에서 강력한 생체 내 활성을 갖는다
- [0999] 표 16에 개략적으로 설명된 바와 같이 다양한 수준의 B7-H4 발현을 갖는 암 세포주를 사용하여 환자 유래 이중 이식편 모델을 생성하였다. 억제된 종양 성장이 모든 모델에서 관찰되었다(도 24 참조). "E02-GL" 항체는 ZYOEQD-E02의 CDR/VH 서열(예를 들어 이에 상응함)을 갖는다("GL"은 항체가 생식세포화되었음을 의미함).
- [1000] 표 16.

모델	암 유형	종양 성장 억제(TGI)(%) *
HBCx-10	유방암(삼중 음성)	90
CTG-012	유방암(삼중 음성)	90
HBCx-11	유방암(삼중 음성)	80
T330	유방암(삼중 음성)	70
HBCx-9	유방암(삼중 음성)	70
T168	유방암(HR+)	60
T272	유방암(HR+)	30
CTG-1106	유방암(삼중 음성)	30
CTG-052	유방암(삼중 음성)	30
CTG-1086	난소암	20
CTG-1153	유방암(삼중 음성)	<10
CTG-0897	난소암	<10
CTG-017	유방암(삼중 음성)	<10
T226	유방암(Her2+)	<10
CTG-0992	난소암	0

- [1001]
- [1002] * 종양 성장 억제(TGI)(%) 0.3 mg/kg E02-GL-SG3249 대 비히클; 최소 제곱 평균(LSM) & TGI = 100*(LSM 비히클 - LSM 'E02-GL-SG3249')/LSM 비히클
- [1003] +++ = 높은 양성 발현; ++ & + = 낮은 양성 발현

- [1004] 실시예 21
- [1005] E02-GL-SG3249는 종양 이중이식편에서 이중 가닥 절단을 초래한다
- [1006] 종양 이중이식편 모델을 생성하고(HCC1954 세포 사용) E02-GL-SG3249로 처리했다. "E02-GL" 항체는 ZY0EQD-E02의 CDR/VH 서열(예를 들어 이에 상응함)을 갖는다("GL"은 항체가 생식세포화되었음을 의미함).
- [1007] 그런 다음 번역조직화학을 수행하여 처리 후 감마 H2AX(이중 가닥 절단의 마커)를 결정했다. 감마-H2AX 양성 종양 세포의 증가된 수는 E02-GL-SG3249 처리 후 최대 10일까지 관찰되었다(도 25 참조).
- [1008] 실시예 22
- [1009] KinExA 3200을 이용한 E02_GL의 친화도 분석
- [1010] KinExA 기술을 사용하여 클론 E02_GL 항-B7H4 Fab와 인간 B7H4의 친화도(KD) 추정치를 얻기 위한 실험을 수행했다. "E02-GL" 항체는 ZY0EQD-E02의 CDR/VH 서열(예를 들어 이에 상응함)을 갖는다("GL"은 항체가 생식세포화되었음을 의미함).
- [1011] 25°C에서 Fab의 5, 10 또는 45 nM의 고정 농도의 존재 하에 다양한 인간 B7H4 농도를 밤새 평형화했다. 이들을 KinExA 3200 및 전역적으로 적합화된 데이터 세트(N-곡선 분석)에서 분석하였다. 결과는 표 17에 요약되어 있다.
- [1012] 표 17.

항체	B7H4	K _D 의 최적 추정치	N-곡선 분석, 설명
E02_GL	인간	1.2 nM	K _D = 1.21 nM, 95% 신뢰 구간 = 0.556 ~ 2.22 nM. h B7H4의 62%가 에피토프 활성화됨, 95% 신뢰 구간 = 51~77%

- [1013]
- [1014] 62%의 h B7H4 활성화 수치는 E02_GL의 Biacore 기반 친화도 평가를 수반하는 R_{max} 계산과 잘 일치한다.
- [1015] 실시예 23
- [1016] mAb "1D11"을 사용한 B7-H4에 대한 E02_GL 결합의 비교
- [1017] 클론 E02_GL을 인간 및 마우스 B7-H4에 대한 결합에 대해 ELISA 분석을 수행하였다. 결합을 mAb 1D11(Genentech) 및 R347 이소형 대조군과 직접 비교하였다. "E02-GL" 항체는 ZY0EQD-E02의 CDR/VH 서열(예를 들어 이에 상응함)을 갖는다("GL"은 항체가 생식세포화되었음을 의미함).
- [1018] E02_GL은 마우스 B7-H4와 비교하여 인간 B7-H4에 대해 더 높은 결합 친화도를 나타낸다(예를 들어, 도 2e 참조). 유리하게는, E02-GL은 ELISA 및 FACs 분석 모두에 의해 입증된 바와 같이 Genentech "1D11" mAb(이는 훨씬 약한 결합을 나타냄)보다 인간 B7-H4에 대해 유의하게 더 강한 결합(친화도)을 나타낸다 - 각각 도 7 및 8 참조. 실제로, Genentech "1D11" mAb는 마우스 B7-H4와 유사한 수준(낮음)으로 인간 B7-H4에 결합한다(E02_GL과 비교할 때 "1D11"은 인간 단백질에 대한 특이성이 적음을 나타냄).
- [1019] 실시예 24
- [1020] E02_GL의 종양 편재화를 보여주는 이미징 연구
- [1021] 재료 및 방법(위)에 개략적으로 설명된 바와 같이, 즉 800CW 표지된 항체(E02_GL)를 사용하여 생체 내 이미징 연구를 수행하였다. "E02-GL" 항체는 ZY0EQD-E02의 CDR/VH 서열(예를 들어 이에 상응함)을 갖는다("GL"은 항체가 생식세포화되었음을 의미함).
- [1022] WT 종양과 비교하여 B7-H4 발현 종양에 대한 B7-H4 Ab(E02_GL)의 우선적인 편재화는 HT29의 경우 3일, 7일, 14일에 관찰되었고; CT26의 경우 3일 및 7일에 관찰되었고, 10일에 p=0.06이었고; 4T1의 경우 7일에 관찰되었다 - 도 26 및 27 참조.
- [1023] 총 방사 효율은 가장 명확한 결과를 생성했다. 종양 부피에 대해 정규화할 때 유사한 경향이 관찰되었다.
- [1024] 실시예 25

- [1025] E02-GL-SG3249를 사용한 독성학 연구
- [1026] E02-GL-SG3249를 수컷 시노물구스 원숭이에게 투여하였다(N = 2/용량 수준). "E02-GL" 항체는 ZY0EQD-E02의 CDR/VH 서열(예를 들어 이에 상응함)을 갖는다("GL"은 항체가 생식세포화되었음을 의미함).
- [1027] 비정상적인 독성은 관찰되지 않았으며 독성은 다른 유사한 PBD-ADC와 일치했다(표준 표적 기관: 신장, 골수, 피부의 모니터링에 의함; 표적 관련 효과의 증거 없음).
- [1028] 약리학 연구
- [1029] E02-GL 항체의 효과 및 작용 기전을 추가로 특성화하기 위해 시험관 내 및 생체 내 약리학 연구를 수행하였다(E02-GL 항체 및 이의 항원-결합 Fab 중간체는 본원에서 "E02-INT"로 지칭됨). E02-GL-SG3932 ADC -GL-SG3932는 B7-H4에 대한 ADC이며 TOP1i warhead에 대한 절단 가능한 말레이미드-PEG8-발린-알라닌 링커(절단 가능한 mal-PEG8-val-ala 링커)를 통해 접합된 항-B7-H4 인간 IgG1k 단클론 항체(즉, E02-GL)로 구성된다. TOP1i warhead는 본원에서 SG3924로 지칭된다. TOP1i 약물은 티오석신이미드 연결을 통해 항체의 천연 시스템에 공유 결합되며, 항체당 약 8개의 약물이 결합된다(즉, DAR 8). E02-GL-SG3932 ADC의 개략도가 도 29a에 제시되어 있다. 경쟁자 ADC와 E02-GL-SG3932 ADC를 구별하는 주요 특징은 도 29b에 제시되어 있다.
- [1030] E02-GL-SG3932 특성은 아래에 기재되어 있으며 본원의 다른 곳에서 추가로 설명되어 있다:
- [1031] · mAb E02-INT: 인간 및 시노물구스 원숭이 B7-H4에 대한 특이적 결합(각각 3.7 nM, 3.94 nM의 친화도)
- [1032] · warhead SG3932
- [1033] · 링커-warhead: 절단 가능한 mal-PEG8-val-ala 링커-SG3932
- [1034] 시험관 내 연구
- [1035] 실시예 26
- [1036] 면역조직화학에 의한 B7-H4 발현 프로파일링
- [1037] B7-H4의 발현 프로파일을 FFPE 정상 시노물구스 원숭이 및 인간 조직 및 인간 종양 조직에서 B7-H4 발현을 입증하기 위해 검증된 IHC 프로토콜을 사용하여 평가하였다.
- [1038] B7-H4는 제한된 수의 정상 인간 조직에서 발현되는 것으로 나타났으며, 존재하는 경우 일반적으로 샘플 내 총 세포의 < 10%에서 발현되었으며(나팔관 및 폐 기관지 제외), 관 상피 또는 세뇨관 상피로 제한되었고, 주로 정단 내강막에 위치하였다(표 18). 유사한 B7-H4 발현 패턴이 정상적인 시노물구스 원숭이 조직에서 검출되었으며(표 2 및 19), 여기서 B7-H4는 관 상피 또는 세뇨관 상피로 제한되고, 주로 정단 내강막과 세포질 내에 위치하는 발현 패턴과 함께 제한된 수의 조직에서 발현되는 것으로 나타났다. 선택된 정상 인간 및 시노물구스 원숭이 조직에서 B7-H4의 면역조직화학 염색의 대표적인 이미지가 도 30에 제시되어 있다.

[1039] 표 18. 면역조직화학을 사용한 인간 정상 조직에서의 B7-H4 발현 결과

조직	B7-H4 IHC 염색을 나타내는 공여자 수	양성 B7-H4 염색을 나타내는 조직의 상대적 비율	강도*	세포 편재화	세부 사항
유방	6/6	< 10%	+ /+++	내강 Ⅲ	관 상피 세포
부고환	3/3	< 5%	++	내강 Ⅲ	관의 내강막
나팔관	3/3	< 30%	++ /+++	내강 Ⅲ	관 상피 염색
신장	11/11	< 5%	++ /+++	내강 Ⅲ > c	간헐적 세뇨관의 내강막 및 일부 세포질 염색
간	2/3	1%	+ /++	내강 Ⅲ	관헐적 작은 담관의 내강막
폐 - 기관지	7/7	< 20%	++ /+++	내강 Ⅲ > c	기관지 상피의 기저 세포 및 기관지선의 간헐적 관 상피
식도	1/3	1%	+	내강 Ⅲ	점막하선의 간헐적 상피세포의 기저외측막
난소	3/6	1%	+ /++	c > Ⅲ	과립막 세포를 보여주는 개별 성숙 난모세포
췌장	8/8	< 5%	+ /+++	내강 Ⅲ	선포중심세포의 내강막과 세포질 및 개재관의 내강 염색

[1040]

조직	B7-H4 IHC 염색을 나타내는 공여자 수	양성 B7-H4 염색을 나타내는 조직의 상대적 비율	강도 ^a	세포 편재화	세부 사항
뇌하수체	3/3	< 5%	++/+++	m > c	모낭 및 라스케트 상피 세포에서 콜로이드의 염색을 나타내는 중간부 세포 내의 간헐적 편재화된 세포
전립선	3/3	< 10%	++/+++	m > c	일부 관의 기저 상피 세포
정소	3/3	< 10%	++/+++	내강 m	여러 관 상피 세포
피부	15/16	< 5%	++/+++	내강 m	간헐적 땀샘 관 상피의 막, 모낭 상피의 막
요관	3/3	< 5%	+ / ++	m > c	일부 기저 요로상피 세포의 세포질 염색
방광	8/8	< 10%	++/+++	내강 m > c	요로상피 세포의 정단면
다른 모든 조직은 양성을 나타내지 않았다 B7-H4 IHC 염색			부신, 대동맥, 동맥, 골수, 뇌, 맹장, 결장, 십이지장, 눈, 심장, 회장, 공장, 폐, 림프절, 신경, 직장, 침샘, 골격근, 척수, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 혀, 질		

[1041]

[1042]

c: 세포질; m: 막.

[1043]

^a 모든 염색된 슬라이드는 B7-H4를 발현하는 세포의 비율, 염색 강도 및 염색의 세포 편재화를 모두 평가하는 병리학자가 검토하고 채점하였다. 강도는 약(+), 중(++) 또는 강(+++)으로 보고된다.

[1044]

병리학자가 IHC를 사용하여 다양한 인간 종양 조직에서 B7-H4 발현을 평가하고 채점하였다. 인간 종양 조직 발현의 요약은 표 19에 상세히 기재되어 있으며, 대표적인 이미지는 도 31에 제시되어 있다.

[1045] 표 19. 면역조직화학을 이용한 인간 종양 조직에서의 B7-H4 발현 결과

종양 표지	높은 B7-H4+ 종양이 있는 공여자의 비율(%) ^a	낮은 B7- H4+ 종양이 있는 공여자의 비율(%) ^b	양성 B7- H4+ 종양이 있는 공여자의 비율(%) ^c	B7-H4+ 종양이 있는 공여자의 총 비율(%) ^d	총 공여자 수
자궁내막 선암종	42.4	45.5	6.1	93.9	66
유방암(T NBC)	28.8	35.1	12.6	76.6	111
유방암(E R+)	32.6	32.3	10.8	75.7	288
유방암(H ER2+)	46.7	23.3	13.3	83.3	30
난소(장 액성 유두)	49.3	28.0	6.7	84.0	75
담관암종	33.3	30.3	21.2	84.8	66
NSCLC- SCC	15.0	27.5	23.5	66.0	153

[1046]

[1047] ^a 높은 B7-H4: 50% 내지 100%의 B7-H4 양성 세포를 함유하는 인간 종양 조직 샘플.

[1048] ^b 낮은 B7-H4: 5% 내지 49%의 B7-H4 양성 세포를 함유하는 인간 종양 조직 샘플.

[1049] ^c 양성 B7-H4: 1% 내지 4%의 B7-H4 양성 세포를 함유하는 인간 종양 조직 샘플.

[1050] ^d 1% 내지 100%의 B7-H4 양성 세포를 함유하는 인간 종양 조직 샘플의 비율을 나타냄.

[1051] 이 실시예는 B7-H4가 유방암, 담관암종, 자궁내막 암종, 비소세포 폐암 편평세포 암종 및 난소 장액 암종을 포함하는 많은 유형의 인간 암에서 발현되었음을 입증한다.

[1052] 실시예 27

[1053] 시노물구스 원숭이, 레서스 원숭이, 마우스 및 랫트에서 인간 B7-H4와 오르소로그의 서열 상동성 비교

[1054] 인간 B7-H4에 대한 아미노산 서열을 확인하고 시노물구스 원숭이, 레서스 원숭이, 마우스 및 랫트에서 오르소로그에 정렬하였다. 동일성 백분율은 이러한 정렬 결과를 기반으로 계산되었다. B7-H4는 비인간 영장류 사이에서 잘 보존되어 있다. 인간 B7-H4(hB7-H4)는 시노물구스 원숭이(cyB7 H4) 및 레서스 원숭이(rhB7-H4) 모두에서 전장 및 세포의 도메인 영역 모두에 대해 각각 98% 및 99%의 서열 동일성을 공유한다(도 32). 설치류 종은 덜 보존되어 있다. 마우스 및 랫트 B7-H4는 전장 B7-H4에 대해 hB7-H4와 각각 87% 및 86%의 서열 동일성을 공유하고, 세포의 도메인에서 hB7-H4와 각각 90% 및 89%의 서열 동일성을 공유한다.

[1055] 이 실시예는 인간 및 비인간 영장류에 걸친 B7-H4의 높은 아미노산 서열 동일성이 E02-GL-SG3932가 시노물구스 원숭이 및 레서스 원숭이 B7-H4에 결합할 가능성이 있음을 시사한다는 것을 입증한다. 대조적으로, 인간, 마우스 및 랫트 B7-H4 사이의 아미노산 동일성 비교는 더 낮은데, 이는 무린 또는 랫트 B7-H4에 대한 E02-GL-SG3932의 결합 가능성이 적다는 것을 나타낸다.

[1056] 실시예 28

[1057] 마우스, 랫트, 시노물구스 원숭이 및 인간 혈청에서 15일 인큐베이션 후 E02-GL-SG3932 안정성

[1058] 티오숙신이미드를 통해 시스템에 연결된 약물을 보유하는 ADC는 레트로-마이클 반응으로 인해 생리학적 환경에서 일부 약물 손실을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이 과정은 접합에 사용되는 시스템과 말레이미드 함유 약물을 재생하여 시간이 지남에 따라 ADC의 DAR을 감소시킨다. 이 탈접합 과정은 티오숙신이미드를 통해 항체에 연결된 약물을 함유하는 ADC의 알려진 특성이다.

[1059] 시노물구스 원숭이, 마우스 및 랫트 혈청에서 E02-GL-SG3932의 안정성을 면역침전법에 이어 환원된 역상 질량분석법(rLCMS)을 사용하여 평가하였다. 측정 결과 E02-GL-SG3932에서 마우스, 랫트 및 시노물구스 원숭이 혈청에

서 인큐베이션한 후 20% 미만의 약물 손실이 발생하며 SG3924의 84.5%, 83.5% 및 82.0%가 15일에 각각 마우스, 랫트 및 시노물구스 원숭이 혈청 샘플에서 E02-GL-SG3932에 부착되어 남아 있었다. 인간 혈청에서 E02-GL-SG3932의 안정성을 인간 B7-H4 코팅된 수지를 사용한 면역포획에 이어 rLCMS(ONC8205-012)에 의해 평가하였다. 측정 결과 인간 혈청에서 인큐베이션 후 약물 손실은 보통이었는데, 81%의 SG3924가 15일에 E02-GL-SG3932에 부착된 상태로 남아 있었다.

[1060] 이 실시예는 약물 방출의 기전이 링커 절단이 아니라 레트로-마이클 반응을 통한 탈접합임을 나타내며, 이는 사슬간 이황화물과 관련된 시스테인 아미노산에 대한 말레이미드 접합에 의해 제조된 다른 ADC와 일치한다.

[1061] 실시예 29

[1062] 재조합 B7-H4 항원에 대한 항체 중간체 E02-INT Fab의 결합 친화도

[1063] 재조합 인간, 시노물구스 원숭이 및 마우스 B7-H4 변이체에 대한 항-B7-H4 항체 E02-INT Fab의 결합 친화도를 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 결정하였다. 표 20에 제시된 해리 상수(K_D) 값은 E02-INT Fab가 유사한 친화도로 고정된 인간 및 시노물구스 B7-H4에 결합함을 입증한다. 대조적으로, 마우스 B7-H4 항원에 대한 E02-INT Fab의 친화도는 인간 B7-H4 항원에 대한 것보다 약 100배 낮다.

[1064] 표 20. SPR에 의해 결정된 인간, 시노물구스 원숭이 및 마우스 B7-H4에 대한 항-B7-H4 항체 중간체 E02-INT Fab의 결합 친화도

종	K_D
인간	3.70 nM
시노물구스 원숭이	3.94 nM
마우스	405 ($\pm$ 15) nM

[1065]

[1066] Fab: 항원 결합 단편

[1067] 실시예 30

[1068] 인간 FcRn 및 Fc γ 수용체에 대한 E02-GL-SG3932의 결합 친화도

[1069] 인간 FcRn 및 Fc γ 수용체에 대한 E02-GL-SG3932의 결합 친화도를 SPR로 평가하였다. E02-GL-SG3932에 대한 인간 FcRn의 정상 상태 결합 친화도(K_D)는 4360 nM이다. huFc γ RI에 대한 E02-GL-SG3932의 평형 KD는 4.35 nM이었다. huFc γ RI Ia, huFc γ RI Ib, huFc γ RI IA-158V 및 huFc γ RI IA-158F에 대한 E02-GL-SG3932의 평형 K_D 는 3307 내지 21640 nM 범위였다.

[1070] 실시예 31

[1071] 재조합 인간 B7-H4 항원에 대한 항체 중간체 E02-INT 및 E02-GL-SG3932의 비교 결합 친화도

[1072] 토포이소머라제 1 링커-warhead의 접합이 E02-INT 항체의 결합 특성에 영향을 미치는지를 평가하기 위해 DELFIA-ELISA 방법 및 SPR 방법을 사용하여 E02-INT 및 E02-GL-SG3932의 결합 친화도를 측정하였다. 도 33에 제시된 바와 같이, DELFIA-ELISA 분석법으로부터의 결과는 E02-INT 및 E02-GL-SG3932가 각각 1.98 nM 및 1.71 nM의 EC50 값으로 고정된 재조합 인간 B7-H4와 유사하게 결합함을 나타낸다. 인간 B7-H4 항원에 대한 E02-INT 및 E02-GL-SG3932의 동역학 속도 상수(k_{on} 및 k_{off}) 및 평형 해리 상수(K_D)는 또한 항체 포획 방법을 사용하여 SPR에 의해 결정되었다. 표 21에 제시된 바와 같이, E02-INT 및 E02-GL-SG3932는 각각 31.1 nM 및 29.3 nM의 KD 값으로 인간 B7-H4에 유사하게 결합한다.

[1073] 표 21. SPR에 의해 결정된 인간 B7-H4에 대한 항체 중간체 E02-INT 및 E02-GL-SG3932의 결합 친화도

종	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)	R_{max} (RU)
E02-INT	9.38×10^4	2.92×10^{-3}	31.1	56.8
E02-GL-SG3932	9.55×10^4	2.80×10^{-3}	29.3	49.7

[1074]

[1075] RU: 공명 단위

[1076] 실시예 30 및 31에 대한 결과는 E02-INT 항체의 결합 특성이 토포이소머라제 1 링커-warhead에 대한 접합 후에

유지됨을 보여준다.

- [1077] 실시예 32
- [1078] 인간, 시노물구스 원숭이 또는 마우스 B7-H4를 발현하는 조작된 HEK 293 세포에 대한 항체 중간체 E02-INT의 세포 결합
- [1079] 유동 세포분석법을 사용하여 형질도입되지 않은 HEK 293 Jump In TREX 세포 및 인간, 무린 또는 시노물구스 원숭이 B7-H4를 안정적으로 발현하는 HEK 293 Jump In TREX 세포에 대한 항체 E02-INT의 결합을 측정했다. 항체 E02-INT는 인간, 무린 및 시노물구스 원숭이 B7-H4를 안정적으로 발현하는 HEK 293 Jump In TREX 세포에 결합하였으나, B7-H4-음성 형질도입되지 않은 HEK 293 Jump In TREX 세포에는 결합하지 않았다(도 34). 무린 B7-H4를 발현하는 HEK 293 Jump In TREX 세포에 대한 결합은 인간 또는 시노물구스 원숭이 B7-H4를 발현하는 세포와 비교하여 감소되었다.
- [1080] 실시예 33
- [1081] 인간 유방암 세포주 및 인간 B7-H4를 안정적으로 발현하는 HT29 세포에 대한 항체 중간체 E02-INT 및 E02-GL-SG3932의 세포 결합
- [1082] 유동 세포분석법을 사용하여 인간 유방암 세포주 MX-1 및 MDA-MB-468 및 인간 B7-H4를 안정적으로 발현하는 조작된 HT29 결장암 세포에 대한 항체 E02-INT 및 E02-GL-SG3932의 결합을 측정하였다. 도 35에 제시된 바와 같이, E02-INT 및 E02-GL-SG3932는 인간 B7-H4를 안정적으로 발현하는 HT29 세포(HT29-huB7-H4 클론 4 및 HT29-huB7-H4 클론 26)와 유사하게 결합했지만, B7-H4-음성 형질도입되지 않은 HT29에는 결합하지 않았다. E02-INT 및 E02-GL-SG3932는 또한 MX-1 및 MDA-MB-468 세포에 결합하여, 항체 중간체 및 ADC가 인간 암 세포주에서 내인성으로 발현된 B7-H4를 인식할 수 있음을 입증했다. E02-INT와 E02-GL-SG3932의 결합은 비슷했다,
- [1083] 실시예 32 및 33은 모 항체의 세포 결합 특성이 토포이소머라제 1 링커-warhead에 대한 접합 후에 유지됨을 입증한다.
- [1084] 실시예 34
- [1085] E02-GL-SG3932의 시험관 내 세포독성
- [1086] E02-GL-SG3932 처리가 세포 생존율에 미치는 영향을 CellTiter-Glo 분석법을 사용하여 표적 음성 인간 결장암 세포주 HT29, 조작된 인간 결장암 세포주 HT29-huB7-H4 클론 26 및 인간 유방암 세포주 MX-1을 사용하여 결정하였다. 도 36에 제시된 바와 같이, E02-GL-SG3932는 B7-H4 발현 HT29-huB7-H4 클론 26 및 MX-1 세포에 대해 각각 0.036 $\mu\text{g/mL}$ 및 0.029 $\mu\text{g/mL}$ 의 IC_{50} 값으로 세포독성이었다. 대조적으로, B7-H4 음성 HT29 세포주에서 E02-GL-SG3932와 이소형 일치 대조군 ADC(NIP228-SG3932) 간에는 활성의 차이가 관찰되지 않았으며, 이는 E02-GL-SG3932가 인간 B7-H4를 발현하는 암세포를 특이적으로 사멸시킬 수 있음을 시사한다.
- [1087] 실시예 35
- [1088] E02-GL-SG3932의 시험관 내 세포독성
- [1089] IgG 항체가 Fab 도메인을 통해 세포 표면 항원에 결합할 때 항체의 Fc 부분은 자연 살해 세포의 Fc γ RIIIa와 맞물릴 수 있다. Fc 도메인과 Fc γ RIIIa의 상호작용은 Fc γ R의 가교결합을 유도하고, 이는 퍼포린과 그랜자임을 함유하는 세포독성 과립의 방출을 유발하여 표적 세포의 사멸을 초래하는데, 이는 항체 의존적 세포 세포독성(ADCC)이라는 과정이다. ADCC 활성을 개시하는 항체 E02-INT 및 E02-GL-SG3932의 가능성을 단리된 1차 인간 NK 세포 및 인간 유방암 SKBR3 세포주를 표적 세포로 사용하여 평가하였다. 이 분석법에서, E02-INT 및 E02-GL-SG3932 둘 모두는 처리되지 않은 공동 배양된 세포보다 ADCC 활성이 유의하게 증가하였다(도 36의 A 내지 C). E02-GL-SG3932 활성은 E02-INT와 비교할 때 약간 감소되지만, 이 차이는 통계적으로 유의하지 않으며, 이는 E02-INT 및 E02-GL-SG3932가 시험관 내에서 ADCC 활성을 유도할 수 있음을 시사한다.
- [1090] 다음으로, 인간 유방암 SK-BR-3 세포를 1 $\mu\text{g/mL}$ E02-GL-SG3932, 항체 중간체 E02-INT, 이소형 일치 대조군 항체 NIP228, 및 이소형 일치 제어 ADC NIP228-SG3932의 존재 하에 6명의 건강한 공여자로부터 단리된 NK 세포와 공동 배양하였다(도 37). ADCC 활성을 세포사멸사 세포에 대한 포스파티딜 세린의 세포외 표면 노출의 Incytec® Annexin V 염료 결합에 의해 평가하여, 밝고 안정적인 적색 형광 신호를 생성했다. 배수 변화는 약물 처리되지 않은 NK/SK-BR-3 공동 배양 세포의 최대 세포 사멸을 기반으로 하였다. 최대 세포 사멸을 실험 웰의 평균 적

색 개체를 스타우로스포르린 처리된 SK-BR-3 세포의 평균 최대 세포 사멸로 나누어 계산했다.

- [1091] 실시예 36
- [1092] 항체 E02-INT의 내재화 및 리소좀 트래피킹
- [1093] MX-1 인간 유방암 세포 및 B7-H4를 과발현하는 HT29 huB7-H4 클론 26 인간 결장암 세포에서 정량적 생세포 이미징 분석을 사용하여 항체 E02-INT의 내재화 및 세포내 트래피킹 특성을 평가하였다. 시간 경과 시퀀스 이미지는 인간 유방암(MX-1) 및 결장암(HT29-huB7-H4 클론 26) 세포주에서 강렬한 E02-INT 막 신호가 0분에서 120분까지 지속된다는 점과 함께, 240분까지 E02-INT의 증가된 내재화를 보여주었다(도 38, 도 39a 및 도 39b). 2개의 세포주에 걸친 내재화 동역학의 측정은 HT29-huB7-H4 클론 26 및 MX-1 세포에 대해 각각 127(± 35 SD)분 및 102(± 18 SD)분의 내재화 반감기를 나타내었다(도 39c).
- [1094] 공초점 현미경을 사용하여 초기 엔도솜 마커인 초기 엔도솜 항원 1(EEA1) 및 리소좀 마커인 리소좀 관련 막 단백질 1(LAMP1)과의 공동 편재화를 측정하여 E02-INT의 세포내 트래피킹을 결정하였다. 도 40에 제시된 바와 같이, E02-INT는 EEA1과의 제한된 공동 국재화를 갖는 LAMP1 장식된 세포하 구획에서 농축되었고, 이는 내재화 후, E02-INT가 세포의 리소좀 구획으로 트래피킹됨을 나타낸다.
- [1095] 실시예 37
- [1096] E02-GL-SG3932 및 SG3924에 의한 DNA 손상 반응 신호전달의 시험관 내 활성화
- [1097] E02-GL-SG3932 또는 이의 TOP1i warhead SG3924로 처리한 후 MX-1 인간 유방암 세포주 및 조작된 결장암 세포주 HT29-huB7-H4 클론 26에서 DDR 경로 활성화를 평가하는 데 웨스턴 블롯팅을 사용했다. 도 41에 제시된 바와 같이, MX-1 세포를 10 μ g/mL E02-GL-SG3932 또는 10 nM SG3924로 처리하자 ATM 신호전달 경로가 활성화되었는데, 이는 24시간의 초기에 ATM(Ser 1981)의 인산화가 증가하였고 72시간의 치료 기간 동안 지속되는 것에 의해 증명되었다. 유사하게, E02-GL-SG3932 및 SG3924는 48시간 및 72시간의 시점에서 관찰되는 ATR(Thr 1989 인산화)의 활성화를 유도하였다. γ H2AX의 증가는 24시간 후 치료 후에 관찰되었고 72시간의 치료 기간 동안 지속되어 DNA 손상을 나타내었다.
- [1098] DDR 신호전달에 대한 E02-GL-SG3932 또는 이의 TOP1i warhead의 효과는 B7-H4를 발현하도록 조작된 결장직장암 세포주 HT29-huB7-H4 클론 26에서도 조사되었다. 도 42에 제시된 바와 같이, 10 μ g/mL E02-GL-SG3932 또는 10 nM SG3924 처리는 DDR 신호전달 경로의 활성화를 초래하였는데, 이는 ATR(Thr 1989), 이의 하류 표적 Chk1(Ser 345) 및 Chk2(Thr 68)의 인산화 증가에 의해 증명되었다. 이러한 인산화의 증가는 72시간의 처리 기간 동안 지속되었다. 유사하게, ATM(Ser 1981) 및 이의 하류 표적 KAP1(Ser 824)의 활성화는 48시간 및 72시간 시점에서 E02-GL-SG3932 및 TOP1i warhead로 처리한 후에 관찰되었다. γ H2AX의 증가는 48시간 후 치료 후에 관찰되었고 72시간의 치료 기간 동안 지속되어 DNA 손상을 나타내었다.
- [1099] 종합하면, 이러한 결과는 E02-GL-SG3932가 TOP1i warhead의 작용 기전과 일치하는 DDR 경로를 활성화한다는 것을 두 가지 상이한 세포주에서 확인시켜 주었다.
- [1100] 생체 내 연구
- [1101] 시험관 내 연구는 E02-GL-SG3932가 인간 및 시노물구스 원숭이 B7-H4에 유사한 친화도로 결합하는 능력, E02-GL-SG3932가 B7-H4를 발현하는 종양 세포에 특이적으로 결합하고 이에 대해 세포독성이 있으며 단리된 1차 NK 세포 공동 배양 분석에서 중간 정도의 ADCC 활성을 유도할 수 있다는 점, E02-GL-SG3932의 항체 중간체(E02-INT)가 종양 세포로 내재화되고 리소좀 구획으로 트래피킹된다는 점 및 E02-GL-SG3932 또는 이의 TOP1i warhead 처리가 B7-H4 발현 세포주에서 DDR 신호전달 경로를 활성화한다는 점을 입증하였다. E02-GL-SG3932의 작용 기전을 추가로 밝히고 이러한 시험관 내 발견이 항종양 활성으로 변환되는지를 결정하기 위해, 생체 내 마우스 모델을 사용하였다.
- [1102] 실시예 38
- [1103] HT29-huB7-H4 클론 26 이종이식편 모델에서의 E02-GL-SG3932의 약리학 연구
- [1104] 면역결핍 CB-17 SCID 마우스를 사용하여 인간 종양 이종이식편 마우스 모델에서 E02-GL-SG3932 처리 후 약력학적 효과를 평가하였다. 동물에 인간 B7-H4를 발현하도록 조작된 인간 결장암 세포주 HT29-huB7-H4 클론 26을 피하(SC) 접종하고 종양의 부피가 대략 250 내지 300 mm³로 성장한 후, 동물을 무작위화하고 각 마우스에게 E02-GL-SG3932 또는 대조군 물품의 IV 주사를 투여하였다. 지정된 시점에서 종양을 수집하고 10% 중성 완충 포르말

린에 고정시킨 다음, 처리하고 파라핀 블록에 포매하였다. IHC 및 이미지 분석 기술을 사용하여 시간 경과에 따른 종양 샘플의 인간 IgG, γ H2AX 병소, 절단된 카스파제-3 및 상피 세포 밀도를 조사하였다. 7 mg/kg E02-GL-SG3932 또는 이소형 일치 대조군 ADC NIP228 SG3932의 단일 IV 투여 후 168시간 후에 수집된 종양에서 인간 IgG, γ H2AX 및 절단된 카스파제-3의 대표적인 IHC 이미지는 도 43의 A 내지 F에 제시되어 있다.

[1105] 도 44의 A 내지 D에 제시된 바와 같이, E02-GL-SG3932의 용량 의존적 축적이 인간 IgG IHC 분석에 의해 가시화된 바와 같이 시간 경과에 따라 종양 세포에서 관찰되었다. E02-GL-SG3932의 축적은 γ H2AX 병소에 대한 양성 염색 증가와 상관관계가 있었으며, 이는 DNA 손상 유도를 의미한다. 대조군과 비교하여 E02-GL-SG3932 처리된 종양에서 상승된 절단된 카스파제-3 및 상피 세포 밀도의 전반적인 감소가 시간 경과에 따라 관찰되었다.

[1106] 종합하면, 이러한 데이터는 E02-GL-SG3932가 종양 세포의 B7-H4에 결합하여 DNA 손상 및 세포자멸사를 유발함을 시사한다.

[1107] 실시예 39

[1108] 피하 인간 유방암 및 결장암 이종이식편 모델에서 E02-GL-SG3932의 항종양 효능 생체 내 효능, PDX

[1109] 면역결핍 CB-17 SCID 마우스를 사용하여 인간 종양 이종이식편 마우스 모델에서 항체 중간체 E02-INT 및 E02-GL-SG3932의 항종양 활성을 조사하였다.

[1110] HT29 또는 HT29-huB7-H4 클론 26 이종이식편 모델

[1111] E02-GL-SG3932를 두 개의 개별 연구에서 한 쌍의 결장암 세포주 이종이식편 모델에서 처음 평가하였다; B7-H4 음성인 HT29 및 HT29 세포주에서 유래되고 인간 B7-H4를 발현하도록 조작된 HT29-huB7-H4 클론 26. 두 연구에서, 동물에게 HT29 또는 HT29-huB7-H4 클론 26 세포를 SC 주사하고 종양의 부피가 평균 178 mm³(HT29) 또는 194 mm³(HT29-huB7-H4 클론 26)로 성장한 후, 동물을 무작위화하고 각 마우스에게 E02-GL-SG3932 또는 대조군 물품의 IV 주사를 투여하였다. 도 45의 A 및 B에 제시된 바와 같이, 비히클 처리된 대조군과 비교하여, E02-GL-SG3932 및 이소형 일치된 대조군 ADC NIP228-SG3932는 10 mg/kg의 단일 IV 용량으로 투여될 때 HT29 이종이식편 종양의 성장을 유의하게 억제하지 않아, 각각 12%(p = 0.7006) 및 14%(p = 0.6593)의 TGI를 나타내었다. 대조적으로, 비히클 처리된 대조군 또는 이소형 일치된 대조군 ADC NIP228-SG3932와 비교하여, E02-GL-SG3932는 5 mg/kg, 2.5 mg/kg 및 1.25 mg/kg의 단일 IV 용량으로 투여되었을 때 HT29-huB7-H4 클론 26 이종이식편 종양의 성장을 유의하게 억제했으며(도 46a 내지 46c), 비히클 대비 TGI가 각각 42%(p < 0.001), 37%(p = 0.0005) 및 31%(p = 0.0039)였다.

[1112] MX-1 유방암 이종이식편 모델

[1113] E02-GL-SG3932, 이소형 일치된 대조군 ADC NIP228-SG3932 및 E02-GL-SG3932의 항체 중간체인 E02-INT의 효과를 MX-1 유방암 이종이식편 모델에서 평가하였다. 동물에게 MX-1 세포를 SC 주사하고 종양의 부피가 평균 270 mm³로 성장한 후 동물을 무작위화하고 각 마우스에게 테스트 물품 또는 대조군 물품의 IV 주사를 투여하였다. 비히클 처리된 대조군과 비교하여, E02-GL-SG3932는 5 mg/kg, 2.5 mg/kg 및 1.25 mg/kg의 단일 IV 용량으로 투여되었을 때 MX-1 이종이식편 종양의 성장을 유의하게 억제하여(도 47의 A 및 B), TGI가 각각 100%(p < 0.001), 96%(p < 0.001) 및 98%(p < 0.001)가 되었다.

[1114] 10 mg/kg 용량으로 투여된 항체 중간체 E02-INT는 종양 성장을 유의하게 억제하지 못했다(TGI = -1%, p > 0.9999). SCID 마우스에서 이 고용량 수준에서 E02-INT의 활성 결여는 ADCC가 생체 내 E02-GL-SG3932의 활성에 유의하게 기여하지 않을 수 있으며 E02-GL-SG3932의 항종양 효과가 이의 TOP1i warhead를 통해 유발됨을 시사한다.

[1115] MX-1 및 MDA-MB-468 유방암 이종이식편 모델

[1116] 생체 내 E02-GL-SG3932 처리의 용량 의존적 효과를 추가로 설명하기 위해 MX-1 및 MDA-MB-468 유방암 이종이식편 모델에서 0.125 mg/kg 내지 2 mg/kg 범위의 용량 수준을 평가하였다. 두 연구에서, 동물에게 MX-1 또는 MDA-MB-468 세포를 SC 주사하고 종양의 부피가 평균 약 138 mm³(MX-1) 또는 120 mm³(MDA-MB-468)로 성장한 후, 동물을 무작위화하고 각 마우스에게 E02-GL-SG3932 또는 대조군 물품의 IV 주사를 투여하였다. 도 48에 제시된 바와 같이, E02-GL-SG3932의 단일 정맥내 용량은 MX-1 이종이식편에서 용량 의존적 억제를 초래하였다. 40일에서의 미처리군과 비교할 때, E02-GL-SG3932 처리는 2 mg/kg, 1.5 mg/kg 및 1 mg/kg 용량 수준에서 100% TGI를 초래하였다. 0.75 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.25 mg/kg 및 0.125 mg/kg의 E02-GL-SG3932 용량은 각각 99.7%, 80.1%, 52.1% 및 -5.5%의 용량 의존적 TGI(%)를 초래하였다. 유사하게, E02-GL-SG3932의 단일 정맥내 용량은 MDA-MB-

468 이종이식편에서 용량 의존적 억제를 초래하였다(도 49). 55일에서의 미처리군과 비교할 때, E02-GL-SG3932 처리는 2 mg/kg, 1.5 mg/kg 및 1 mg/kg 용량 수준에서 각각 97.7%, 75.2% 및 66.6%의 TGI를 초래하였다. 0.75 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.25 mg/kg 및 0.125 mg/kg의 E02-GL-SG3932 용량은 각각 52.8%, 58.4%, 25.5% 및 31.8%의 용량 의존적 TGI(%)를 초래하였다.

[1117] 실시예 40

[1118] 삼중 음성 유방암의 환자 유래 이종이식편 모델에서의 E02-GL-SG3932의 항종양 효능

[1119] E02-GL-SG3932의 항종양 활성을 면역손상 무흉선 누드 마우스를 사용하여 26개의 인간 TNBC PDX 모델의 패널에서 조사하였다. 이러한 PDX 모델은 사전 시험관 내 배양 없이 인간 종양 샘플에서 확립되었으며 조직학, 세포유전학, 유전학 및 기타 생물학적 마커 및 표준 치료 요법에 대한 반응에 대해 연구되었다. 종양 절편을 마우스에 피하 이식하고 종양의 부피가 대략 94 내지 189 mm³로 성장하면 동물을 무작위화하고 각 마우스에게 1.25 mg/kg 또는 3.5 mg/kg의 용량으로 E02-GL-SG3932 또는 대조군 물품의 단일 IV 주사를 투여하였다. B7-H4 발현과 효능 사이의 관계를 평가하기 위해, 각 모델에서 3마리의 추가 마우스로부터 약 500 내지 1183 mm³의 부피의 처리되지 않은 신선한 종양을 수집하고, 10% 중성 완충 포르말린에 고정시킨 다음, 처리하고, 파라핀 블록에 포매하였다. 그런 다음 IHC 및 이미지 분석 기술을 사용하여 각 모델의 종양 세포막에서 B7-H4의 발현을 특성화하였다.

[1120] IHC 분석은 B7-H4의 거의 검출 불가능한 수준을 갖는 하나의 모델(HBCx-15)을 포함한 이러한 PDX 모델이 상이한 수준의 IHC 염색 강도 및 종양 염색 비율을 갖는 B7-H4의 이종 종양 발현을 나타냄을 입증하였다(도 50).

[1121] 종양 성장 억제는 1.25 mg/kg E02-GL-SG3932의 단일 용량 후 관찰되었으며, 모델의 46.2%(26개 중 12개)가 기준선으로부터 30% 이상의 종양 부피 감소를 나타냈다(도 51). 이 중 75%(12개 중 9개)는 H 점수가 100 이상인 상승된 B7-H4 수준을 나타냈다(도 52a 및 52b). 1.25 mg/kg 용량 수준에서 E02-GL-SG3932에 대해 H 점수 분류와 반응자 상태 사이의 유의한 연관성이 확인되었으며(Fisher의 정확 검정, $p = 0.047$), 이는 B7-H4의 상승된 수준이 1.25 mg/kg E02-GL-SG3932 처리에 대한 반응과 관련이 있음을 시사한다.

[1122] 1.25 mg/kg 용량 수준과 비교하여, 3.5 mg/kg E02-GL-SG3932의 단일 용량 후에 더 큰 항종양 활성이 관찰되었으며, 테스트한 모델의 69.2%(26개 중 18개)가 기준선으로부터 30% 이상의 종양 성장 감소를 나타냈다(도 53). 이 중 66.7%(18개 중 12개)는 H 점수가 100 이상인 상승된 B7-H4 수준을 나타냈다(도 54의 A 및 B). 이 용량 수준에서 H 점수 분류와 반응자 상태 간의 연관성은 통계적으로 유의하지 않았다(Fisher의 정확 검정, $p = 0.073$).

[1123] 이 용량 수준에서 NIP228-SG3932 이소형 ADC에 대한 증가된 활성도 관찰되었으며, 5개 모델(T330, BCX-017-LOP, T168, HBCx-15 및 HBCx-6)은 기준선으로부터 30% 이상의 종양 성장 감소를 나타냈다(도 53). 이 5개 모델에는 공통된 특성이 있다; BRCA1 돌연변이 또는 RAD51 병소 형성 분석에서 음의 점수의 존재로 정의되는 결합 있는 상동 DNA 수복, 이는 상동 DNA 수복 능력의 기능적 척도로 제안된다.

[1124] 이 실시예는 B7-H4 발현 수준이 상승하였고 (1) BRCA1 돌연변이의 존재, (2) RAD51 병소 형성 분석에서 음의 점수로 정의되는 상동 DNA 수복에 결합이 있는 종양에서 E02-GL-SG3932의 투여는 종양 부피를 감소시킬 수 있음을 입증한다. 도 53b 내지 53e는 저용량에서 E02-GL-SG3932 반응이 B7-H4 발현 수준 및 HR 결핍과 상관관계가 있음을 보여준다. 별도의 연구에서, 7 mg/kg으로 처리된 PDX 모델은 높은 수준의 이소형 대조군 ADC 활성을 나타냈다(도 60a 내지 60b 및 도 61).

[1125] 이 실시예는 또한 E02-GL-SG3932가 HR 결핍 종양 및 상승된 B7-H4를 갖는 HR 능숙 종양에서 강력한 활성을 나타내고, HR 결핍 종양이 TOP1i에 의한 손상에 더 민감하며 활성에 대해 더 낮은 B7-H4 발현 역치를 가질 것임을 입증한다.

[1126] 실시예 41

[1127] 담관암종의 환자 유래 이종이식편 모델에서의 E02-GL-SG3932의 항종양 효능

[1128] E02-GL-SG3932의 항종양 활성을 37개의 인간 담관암종 PDX 모델의 패널에서 조사하였다. 사전 연구 단계에서 다양한 배경의 암컷 마우스(무흉선 누드 마우스, Balb/c 누드 또는 NOD/SCID)에게 인간 담관암종 PDX 절편을 이식하고 크기가 약 1000~1500 mm³로 성장하도록 했다. 그런 다음 이 종양을 수확하여 연구 마우스에 재이식했다. 종양이 150~300mm³의 평균 종양 부피에 도달하면 동물을 종양 부피에 따라 치료군 또는 대조군으로 매치시키고 0일에 투약을 개시하였다. 각 마우스에게 1.25 mg/kg 또는 3.5 mg/kg의 용량으로 E02-GL-SG3932 또는 대조군(미처리)의 단일 IV 주사를 투여하였다. 도 55a 내지 55g는 첫 번째 조사된 패널에 대한 결과를 제공한다. 도

56a 내지 56k에 제시된 결과는 두 번째 조사된 패널에 대한 결과를 제공한다.

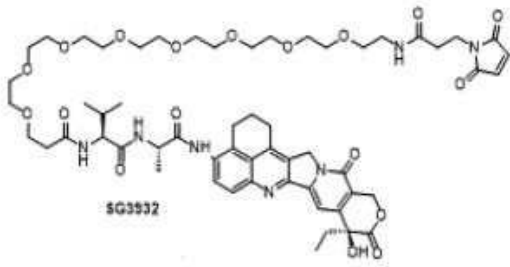
[1129] 실시예 42

[1130] E02-GL-SG3932 TOP1i 링커-Warhead는 더 넓은 치료 지수(TI)와 관련이 있다

[1131] E02-GL-SG3932에 대해 선택된 AZ'0133 링커-warhead의 일대일 비교 연구를 수행하여 4개의 대체 링커가 있는 SG3932 warhead의 효능, 약동학 및 독성을 결정하였다. 절단 가능한 mal-PEG8-val-ala 링커-SG3932 링커-warhead ADC는 가장 넓은 상대 TI를 제공하고 벤치마크와 비교하여 유리하다. 4개의 비교 링커-warhead가 아래에 제공된다. 비교 연구로부터 수집된 데이터는 표 22에 제시되어 있다.

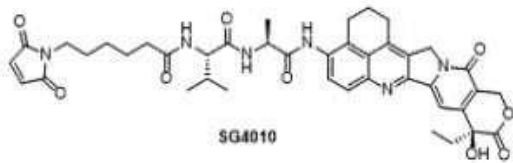
[1132] 비교 링커-Warhead

[1133] E02-INT-절단 가능한 mal-PEG8-val-ala 링커-SG3932



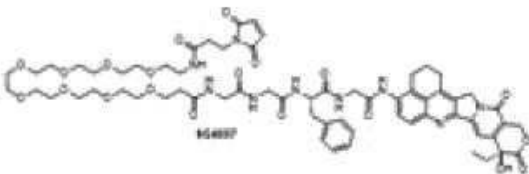
[1134]

[1135] E02-INT-SG4010



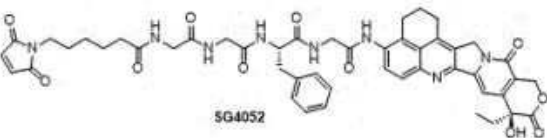
[1136]

[1137] E02-INT-SG4057



[1138]

[1139] E02-INT-SG4052



[1140]

[1141] 표 22: 4개의 대체 링커가 있는 E02-INT 항체의 효능, PK 및 독성의 일대일 비교 연구

	E02-INT-SG3932	E02-INT-SG4010	E02-INT-SG4057	E02-INT-SG4052
링커 + Warhead	mp-PEG8-Val-Ala-SG3932	mc-Val-Ala-SG3932	mp-PEG8-GGFG-SG3932	mc-GGFG-SG3932
소수성(HIC), 체류 시간(분)	3.41	3.37	3.76	3.53
시험관 내 혈청 안정성(0 일 대비 15일에서의 평균 탈접합(%))	24	68.4	28.4	69
시험관 내 세포독성 IC50 MX1/HT29 클론 26(ng/mL)	8.81 / 53.3	5.54 / 40.6	14.4 / 44.0	6.21 / 67.6
생체 내 효능 MX-1, 종양 정제/30% 퇴행 용량(mg/kg)	0.57 / 1.27	0.83 / 1.18	0.92 / 1.02	1.02 / 1.85
생체 내 효능 MDA-MB-468, 종양 정제/30% 퇴행 용량(mg/kg)	0.89 / 1.35	0.71 / 1.47	1.12 / 1.85	1.16 / 1.98
SCID 마우스 PK - CL(ml/일/kg) @ 1.25 mg/kg	11.3	20.4	14.6	19.0
랫트 PK - CL(ml/일/kg) @ 60 mg/kg(HNSTD)	7.57	13.3	10.3	24.3
랫트 독성학 연구(20 또는 60 mg/kg 용량 후 배경/대조군에 비해 심각도가	1/7	3/7	3/7	4/7

[1142]

높은 소견의 수)				
MX-1 에서 종양 정제에 대한 상대 TI	152	101	82	44
MX-1 에서 7일에서의 30% 종양 퇴행에 대한 상대 TI	68	71	45	39

[1143]

[1144] E02-GL-SG3932에 대한 mp-PEG8-Val-Ala-SG3932 링커-warhead는 각 비교기보다 더 잘 수행하였다. 절단 가능한 mal-PEG8-val-ala 링커-SG3932 링커-warhead로 제조된 ADC는 E02-INT 항체에 접합될 때 생체 내에서 가장 활성 이다(도 57의 A 및 B). 절단 가능한 mal-PEG8-val-ala 링커-SG3932 링커-warhead ADC는 도 58에 제시된 바와 같이 랫트 독성 연구에서 가장 깨끗한 안전성 프로파일을 나타낸다. 절단 가능한 mal-PEG8-val-ala 링커-SG3932 링커-warhead ADC는 도 59에 제시된 바와 같이 양호한 PK 특성 및 가장 넓은 상대 TI를 갖는다. 상대 TI = 종양

정체(MX-1 모델)를 제공하는 AUC에 대한 랫트에서 테스트한 최고 용량(HNSTD가 아닌 NOAEL)에서의 AUC의 노출 비율.

- [1145] 도 29b에 제시된 바와 같이, 절단 가능한 mal-PEG8-val-ala 링커-SG3932 링커-warhead는 경쟁자 TOP1i 접합된 ADC와 차별화될 수 있으며 TI에 기여하고 이점을 제공하는 것으로 생각되는 주요 특징을 함유한다. 특히, 절단 가능한 mal-PEG8-val-ala 링커-SG3932의 mp-PEG는 접합체를 안정화시키고 ADC 안정성에 기여하며, 절단 가능한 mal-PEG8-val-ala 링커-SG3932의 락톤 스위치는 ADC에 부착되는 동안 개방될 수 있는데, 이는 수용체 매개 세포 내이입(RME)에 의한 내재화에 따라 warhead 효능을 증가시킨다. (도 29b)
- [1146] 도 60a 및 60b는 E02-GL-SG3932가 유방 및 난소 PDX에서 강력한 활성을 가짐을 보여준다. 패널 a: E02-GL-SG3932의 항종양 활성을 유방 및 난소 PDX 모델의 패널에서 조사하였다. 각 마우스(군당 N=1)에게 7 mg/kg 또는 3.5 mg/kg의 용량으로 E02-GL-SG3932 또는 대조군(미처리)의 단일 IV 주사를 투여하였다. 도 60b는 TNBC PDX 모델의 패널에서의 항종양 활성을 보여준다. 각 마우스에게 3.5 mg/kg 또는 1.25 mg/kg의 용량으로 E02-GL-SG3932 또는 비히클 대조군의 단일 IV 주사를 투여하였다.
- [1147] E02-GL-SG3932는 또한 HR 결핍 종양 및 상승된 B7-H4를 갖는 HR 능숙 종양에서 강력한 활성을 보여준다(도 61 및 62a 내지 62d).
- [1148] 또한, HR 결핍은 SG3932 warhead에 대한 민감도를 증가시킨다. 도 63에 제시된 바와 같이, 디메틸설폭사이드(DMSO) 처리 및 음성 대조군 미세소관 억제제 warhead(MMAE)와 비교하여 SG3932 warhead의 효능 변화. 도 63에 제시된 바와 같이, 야생형 및 BRCA2-/- 세포를 DMSO로 처리한 경우 세포 생존율은 100% 이상이었다. MMAE warhead로 처리했을 때 야생형 및 BRCA2-/- 세포에서 세포 생존율은 감소했다. 야생형 세포가 MMAE warhead에 비해 SG3932 warhead로 처리되었을 때 생존율의 큰 감소가 나타났다. 그러나 BRCA2-/- 세포를 SG3932 warhead로 처리했을 때 생존율의 가장 큰 감소(효능의 약 349배 변화)가 나타났다. 이는 HR 결핍이 SG3932 warhead에 대한 민감도를 증가시킴을 입증한다.
- [1149] 토포이소머라제 I 억제제의 합성
- [1150] 일반 정보
- [1151] 플래쉬 크로마토그래피는 Biotage® Isolera™을 사용하여 수행하였고, 박층 크로마토그래피(TLC)를 사용하여 분획의 순도를 확인하였다. TLC는 알루미늄 플레이트에서 형광 표식자가 있는 Merck Kieselgel 60 F254 실리카 겔을 사용하여 수행하였다. UV 광으로 TLC를 시각화하였다.
- [1152] 추출 및 크로마토그래피 용매를 VWR(U.K.)로부터 구입하여, 추가 정제 없이 사용하였다.
- [1153] 달리 명시되지 않는 한, 모든 정밀 화학물질은 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다. 폐길화 시약은 Stratech UK를 통해 Quanta biodesign US로부터 입수하였다.
- [1154] LC/MS 조건
- [1155] 방법 A
- [1156] Waters Aquity H-class SQD2를 사용하여 포지티브 모드 전기분무 질량 분석을 수행하였다. 이동상으로 용매 A(0.1% 포름산이 포함된 물) 및 용매 B(0.1% 포름산이 포함된 아세트ونی트릴)를 사용하였다. 초기 조성 5% B에서 25초 간 유지한 후, 1분 35초에 걸쳐 5% B에서 100% B로 증가시켰다. 조성을 100% B에서 50초 간 유지한 후, 5초 내에 5% B로 회복시키고, 5초 동안 유지시켰다. 총 구배 실행 시간은 3.0분이었다. 유속은 0.8 mL/분이었다. 254 nm에서 검출하였다. 컬럼: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard 프리-컬럼(130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm×5 mm)이 장착된 Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18(1.7 µm, 2.1×50 mm, 50°C).
- [1157] 방법 B
- [1158] 물(A)(포름산 0.1%) 및 아세트ونی트릴(B)(포름산 0.1%)의 이동상을 사용하여 HPLC(Waters Alliance 2695)를 수행하였다. 초기 조성 5% B에서 25초 간 유지한 후, 1분 35초에 걸쳐 5% B에서 100% B로 증가시켰다. 조성을 100% B에서 50초 간 유지한 후, 5초 내에 5% B로 회복시키고, 5초 동안 유지시켰다. 총 구배 실행 시간은 3.0분이었다. 유속은 0.8 mL/분이었다. 파장 검출 범위: 190 내지 800 nm. 컬럼: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard 프리-컬럼(130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm×5 mm)이 장착된 Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18(1.7 µm, 2.1×50 mm, 50°C).

[1159] 방법 C

[1160] 물(A)(포름산 0.1%) 및 아세토니트릴(B)(포름산 0.1%)의 이동상을 사용하여 HPLC(Waters Alliance 2695)를 수행하였다.

[1161] 초기 조성 5% B에서 1분 간 유지한 후, 9분에 걸쳐 5% B에서 100% B로 증가시켰다. 조성을 100% B에서 2분 간 유지한 후, 0.10분 내에 5% B로 회복시키고, 3분 동안 유지시켰다. 총 구배 실행 시간은 15분이었다. 유속은 0.6 mL/분이었다. 파장 검출 범위: 190 내지 800 nm. 오븐 온도: 50℃. 컬럼: ACE Excel 2 C18-AR(2 μ, 3.0 x 100 mm).

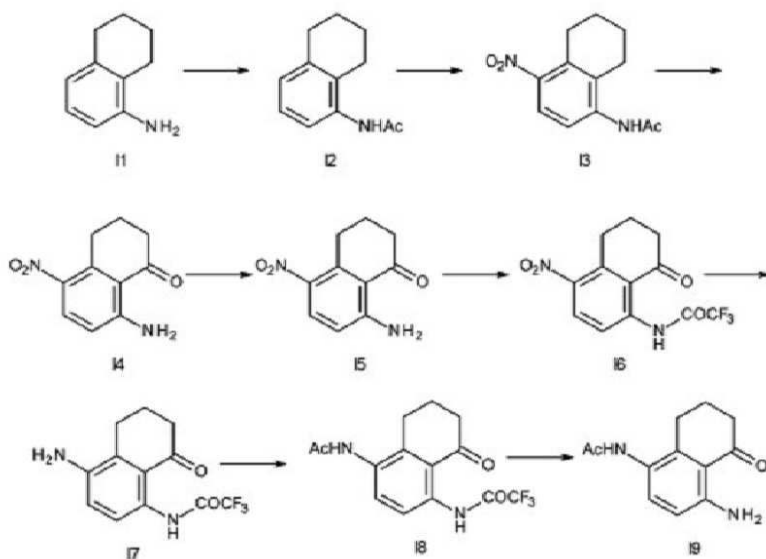
[1162] HPLC 조건

[1163] Phenomenex™ Gemini NX 5μ C18 컬럼(50℃에서) 치수: 150 x 21.2 mm를 사용하여 Shimadzu Prominence™ 기계에서 역상 초고속 고성능 액체 크로마토그래피(ultra-fast high-performance liquid chromatography: UFLC)를 수행하였다. 사용된 용리액은 용매 A(0.1% 포름산 함유 H₂O) 및 용매 B(0.1% 포름산 함유 CH₃CN)였다. 모든 UFLC 실험은 구배 조건으로 수행하였다: 초기 조성 13% B를 3분에 걸쳐 30% B로 증가시킨 후, 8분에 걸쳐 45% B로 증가시키고, 6분에 걸쳐 다시 100%로 증가시킨 후, 2분에 걸쳐 13%로 회복시키고, 1분 동안 유지하였다. 총 구배 실행 시간은 20.0분이었다. 유속은 20.0 mL/분이었고, 254 및 223 nm에서 검출하였다.

[1164] NMR 방법

[1165] 양성자 NMR 화학적 이동 값은 Bruker AV400을 사용하여 400 MHz에서 텔타 스케일로 측정하였다. 다음의 약어를 사용하였다: s(단일향); d(이중향); t(삼중향); q(사중향); quin(오중향); m(다중향); br(광폭). 커플링 상수는 Hz로 기록하였다.

[1166] 주요 중간체의 합성



[1167]

[1168] a) N-(5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드(**I2**)

[1169] 5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-아민 **I1**(8.54 g, 58.0 mmol)을 디클로로메탄(80 mL)에 용해시켰다. 트리에틸아민(18 mL, 129 mmol)을 첨가하고 혼합물을 0℃까지 냉각시켰다. 아세트산 무수물(11.5 mL, 122 mmol)을 적가하고, 첨가 완료시, 반응 혼합물을 실온으로 가온하고 45분 동안 교반한 결과, LCMS는 반응이 완료되었음을 나타냈다. 혼합물을 CH₂Cl₂로 희석하고, H₂O, sat. NaHCO₃, 10% 시트르산으로 세척하고, 유기상을 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 진공 하에서 농축시켰다. 미색 고체를 1:3 Et₂O/이소헥산으로 분쇄하여 **I2**(10.8 g, 57.1 mmol, 98% 수율)를 백색 고체로서 수득하고, 추가 정제 없이 사용하였다. LC/MS (방법 A): 체류 시간 1.44분(ES+) *m/z* 190 [*M* + H]⁺

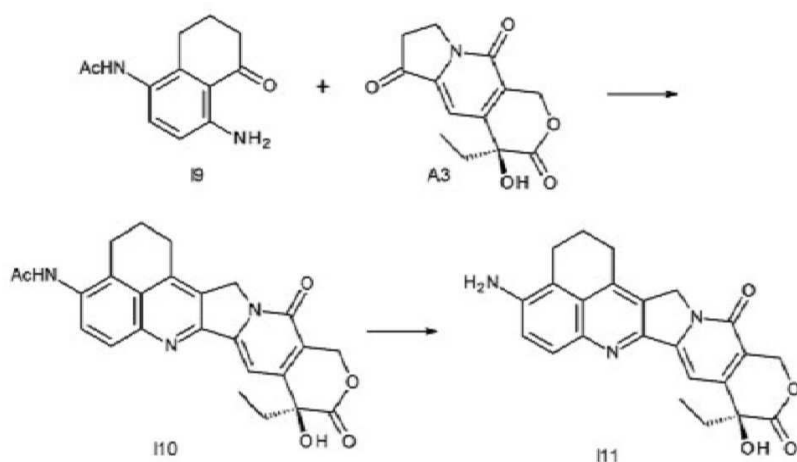
[1170] b) N-(4-니트로-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드(**I3**)

- [1171] N-(5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드 **I2**(1.00 g, 5.2840 mmol)를 -5℃에서 황산(15 mL, 281 mmol)에 조금씩 첨가하였다. 질산나트륨(450 mg, 5.2945 mmol)을 반응 혼합물에 조금씩 첨가하고 -5℃에서 30분 동안 교반한 결과, LCMS는 더 이상의 반응 진행을 나타내지 않았다. 반응 혼합물을 외부 냉각시키면서 얼음에 붓고, 수성 혼합물을 CH_2Cl_2 로 추출하고, 유기상을 MgSO_4 로 건조시키고, Isolera(이소헥산 중의 10~80% EtOAc)로 정제하여 N-(4-니트로-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드 **I3**과 N-(2-니트로-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드의 혼합물(956 mg, 4.0811 mmol, 77% 수율)을 백색/황색 고체로서 수득하였다. LC/MS (방법 A): 체류 시간 1.53분(ES+) m/z 235 $[M + H]^+$.
- [1172] c) N-(4-니트로-8-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드(**I4**)
- [1173] N-(4-니트로-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드 **I3**(1.01 g, 4.31 mmol)을 아세톤(30 mL)에 용해시켰다. 물 중의 황산마그네슘(3.9 mL, 5.9 mmol, 1.5 mol/L)을 첨가하고 혼합물을 0℃까지 냉각시켰다. 과망간산칼륨(2.07 g, 13.0 mmol)을 반응 혼합물에 조금씩 첨가하고, 반응 혼합물을 실온으로 가온하고 50분 동안 교반한 결과, LCMS는 반응이 완료되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고, 고체를 CHCl_3 로 세척하고, 생성된 유기 혼합물을 H_2O , 염수로 세척하고, MgSO_4 로 건조시키고, isolera(이소헥산 중의 20~50% EtOAc)로 정제하여, N-(4-니트로-8-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드 **I4**와 N-(2-니트로-8-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드의 혼합물(709 mg, 2.86 mmol, 66%)을 백색/황색 고체로서 수득하였다. LC/MS (방법 A): 체류 시간 1.44분(ES+) m/z 190 $[M + H]^+$.
- [1174] d) 8-아미노-5-니트로-3,4-디하이드로나프탈렌-1(2H)-온(**I5**)
- [1175] N-(4-니트로-8-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드 **I4**와 N-(2-니트로-8-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드의 혼합물(709 mg, 2.8561 mmol) 및 6 N 염산(7 mL)을 80℃에서 2.5시간 동안 교반한 결과, LCMS는 반응이 완료되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 빙조에서 냉각시키고, pH가 염기성이 될 때까지 6 N NaOH 용액을 첨가하였다. 수성 혼합물을 CH_2Cl_2 로 추출하고, 유기상을 MgSO_4 로 건조시키고, 진공에서 농축시켰다. Isolera(이소헥산 중의 0~50% EtOAc)는 8-아미노-5-니트로-3,4-디하이드로나프탈렌-1(2H)-온 **I5**(320 mg, 1.552 mmol, 54% 수율)을 황색/주황색 고체로서 제공하였다. LC/MS (방법 A): 체류 시간 1.54분(ES+) m/z 207 $[M + H]^+$.
- [1176] e) 2,2,2-트리플루오로-N-(4-니트로-8-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드(**I6**)
- [1177] 8-아미노-5-니트로-3,4-디하이드로나프탈렌-1(2H)-온 **I5**(430 mg, 2.0854 mmol)를 디클로로메탄(20 mL)에 용해시켰다. 피리딘(340 μL , 4.20 mmol)을 첨가하고 혼합물을 0℃까지 냉각시켰다. 트리플루오로아세트산 무수물(590 μL , 4.197 mmol)을 첨가하고 30분 동안 교반한 결과, LCMS는 반응이 완료되었음을 나타냈다. 혼합물을 CH_2Cl_2 로 희석하고, H_2O 로 세척하고, 유기상을 MgSO_4 로 건조시키고, 진공에서 농축하여 2,2,2-트리플루오로-N-(4-니트로-8-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드 **I6**(630 mg, 2.0846 mmol, 99% 초과 수율)을 황색 고체로서 수득하고, 추가 정제 없이 사용하였다. LC/MS (방법 A): 체류 시간 1.86분(ES+) m/z 301X $[M - H]^-$.
- [1178] f) N-(4-아미노-8-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)-2,2,2-트리플루오로아세트아미드(**I7**)
- [1179] 아연(2.73 g, 41.7 mmol)을 메탄올(80 mL), 포름산(4 mL), 및 물(4 mL)에 현탁시키고 혼합물을 0℃까지 냉각시켰다. 2,2,2-트리플루오로-N-(4-니트로-8-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드 **I6**(568 mg, 2.0865 mmol)을 조금씩 첨가하고 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반한 결과, LCMS는 반응이 완료되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 여과하고, 여과액을 EtOAc로 희석하고, 포화 NaHCO_3 로 세척하였다. 유기상을 MgSO_4 로 건조시키고 진공에서 농축하여 N-(4-아미노-8-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)-2,2,2-트리플루오로아세트아미드 **I7**(568 mg, 2.0865 mmol, 99% 초과 수율)을 황색 고체로서 수득하고, 추가 정제 없이 사용하였다. LC/MS (방법 A): 체류 시간 1.65분(ES+) m/z 273 $[M + H]^+$.
- [1180] g) N-(4-아세트아미도-8-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)-2,2,2-트리플루오로아세트아미드(**I8**)
- [1181] N-(8-아미노-4-옥소-테트라린-5-일)-2,2,2-트리플루오로아세트아미드 **I7**(568 mg, 2.0865 mmol)을 디클로로메탄(20 mL)에 용해시켰다. 트리에틸아민(580 μL , 4.16 mmol)에 이어 아세틸 클로라이드(297 μL , 4.173 mmol)

를 첨가하고 혼합물을 30분 동안 교반한 결과, LCMS는 반응이 완료되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 CH_2Cl_2 로 희석하고, H_2O 로 세척하고, 유기상을 MgSO_4 로 건조시키고, 진공에서 농축하여 *N*-(8-아세트아미도-4-옥소-테트라린-5-일)-2,2,2-트리플루오로-아세트아미드 **18**(655 mg, 2.084 mmol, 99% 초과 수율)을 황색 고체로서 수득하고, 추가 정제 없이 사용하였다. LC/MS (방법 A): 체류 시간 1.55분(ES+) m/z 315 [$M + H$]⁺

[1182] h) *N*-(4-아미노-5-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아세트아미드(**19**)

[1183] *N*-(8-아세트아미도-4-옥소-테트라린-5-일)-2,2,2-트리플루오로-아세트아미드 **18**(2.77 g, 8.81 mmol)을 메탄올(240 mL) 및 물(17 mL)에 용해시켰다. 탄산칼륨(4.88 g, 35.3 mmol)을 첨가하고 혼합물을 50℃에서 1.5시간 동안 교반한 결과, LCMS는 반응이 완료되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 냉각하고, 진공에서 농축하고, CH_2Cl_2 중의 10% MeOH에 용해시키고, H_2O 로 세척하였다. 유기상을 MgSO_4 상에서 건조시키고, isolera 크로마토그래피(CH_2Cl_2 중의 2~15% MeOH)에서 정제시켜 *N*-(8-아미노-1-옥소-테트라린-5-일)아세트아미드 **19**(1.20 g, 5.50 mmol, 62.3% 수율)를 황색 고체로서 제공하였다. LC/MS (방법 A): 체류 시간 0.98분(ES+) m/z 219 [$M + H$]⁺



[1184]

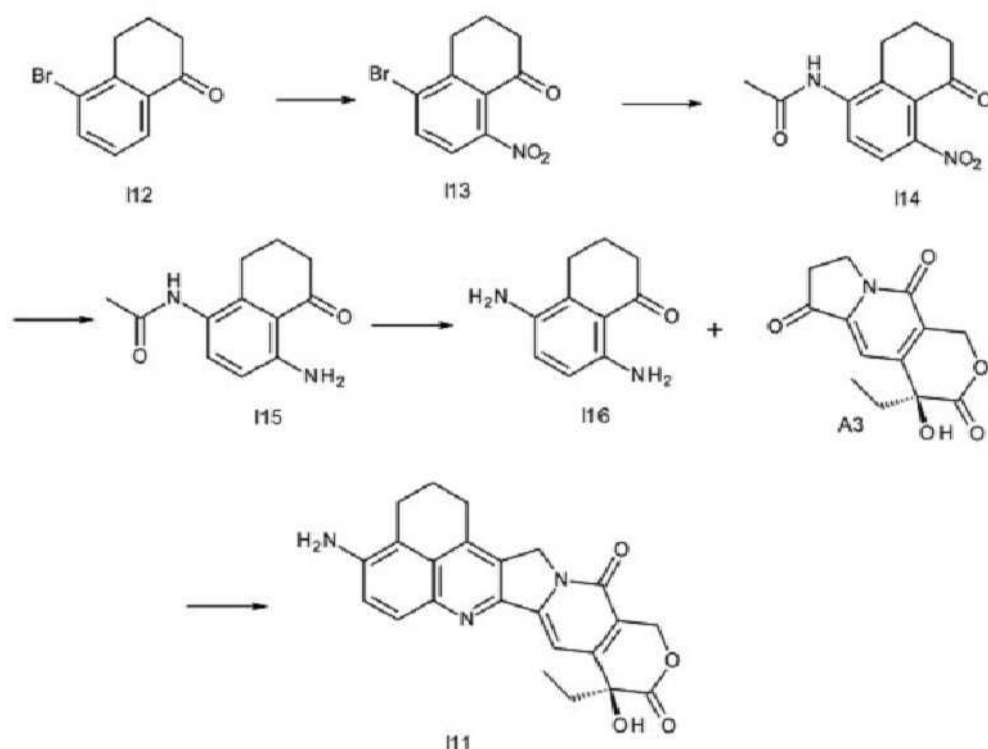
[1185] i) (S)-*N*-(9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)아세트아미드(**110**)

[1186] *N*-(8-아미노-1-옥소-테트라린-5-일)아세트아미드 **19**(641 mg, 2.94 mmol, 1.0 당량), (S)-4-에틸-4-하이드록시-7,8-디하이드로-1H-피라노[3,4-f]인돌리진-3,6,10(4H)-트리온 **A3**(840 mg, 3.19 mmol, 1.1 당량), 및 PPTS(740 mg, 2.95 mmol, 1.0 당량)를 톨루엔(60 mL)에 용해시키고 3시간 동안 환류 교반한 결과, LCMS는 **19**가 소모되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 냉각시키고, 진공에서 농축하였다. 생성된 고체를 아세트ونی트릴, 이어서 아세톤으로 분쇄하여 **110**을 약간의 TsOH 오염이 있는 갈색 고체(1.26 g, 96%)로서 수득하였다. LC/MS (방법 A): 체류 시간 1.32분(ES+) m/z 447 [$M + H$]⁺

[1187] j) (S)-4-아미노-9-에틸-9-하이드록시-1,2,3,9,12,15-헥사하이드로-10H,13H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-10,13-디온(**111**)

[1188] (S)-*N*-(9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)아세트아미드(**110**)(1.26 g, 2.83 mmol, 1.0 당량)를 H_2O (12 mL) 중의 염산(6 mol/L)에 용해시키고, 혼합물을 80℃에서 5시간 동안 교반한 결과, LCMS는 **110**이 소모되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 H_2O 로 희석하고 진공에서 농축하여 (S)-4-아미노-9-에틸-9-하이드록시-1,2,3,9,12,15-헥사하이드로-10H,13H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-10,13-디온 **111**(1.51 g, 2.85 mmol, 90 질량%, 101% 수율)을 적색 결정질 고체로서 수득하였다. LC/MS (방법 A): 체류 시간 1.36분(ES+) m/z 405 [$M + H$]⁺.

[1189] I11의 대체 합성



[1190]

[1191] 이러한 합성을 위한 IPC, 순도, 및 분석 방법

기기	Thermo U-3000		
컬럼	ACE Excel 3 C18- PFP(3.0 mm×150 mm)		
오븐	40°C		
이동상	A: 물 중의 10 mM 포름산암모늄(pH 3.5) B: CAN		
구배 프로그램	시간(분)	A%	B%
	0.0	90	10
	20.0	10	90
	23.0	10	90
	24.0	90	10
	30.0	90	10
	재평형 시간: 6 분		
유속	1.0 ml/분		
검출기	UV 220 nm		
희석제	CAN		

[1192]

[1193] a) 5-브로모-8-니트로-테트라린-1-온(I13)

[1194]

황산(Conc., 5.0 상대부피, 160 mL)에 용해된 질산칼륨(1.15 당량, 13.83 g)의 용액을 질소 하에 황산(Conc., 5.0 상대부피, 160 mL) 중의 5-브로모테트라린-1-온(I12)(1.0 당량, 26.77 g)의 용액에 첨가하였다(첨가 시간 4~12시간, 10°C 미만으로 온도 유지). 반응이 완료된 후, 온도를 10°C 미만으로 유지하도록 이동 속도를 조정하면서 반응 혼합물을 물(36 상대부피, 1.15 L)이 담긴 플라스크로 옮겼다. 생성된 고체를 여과하고, 물(4.0 상대부피, 128 mL)로 3회 세척한 후, 약 40°C에서 24시간 동안 건조시켰다. 건조 케이크를 약 75°C로 가열된 아세톤(2.5 상대부피, 80 mL)과 물(0.38 상대부피, 12.2 mL)의 혼합물에 용해시킨 후 약 20°C까지 냉각시켰다. 생성된 고체를 여과로 제거하였다. 용매를 증류를 통해 에탄올로 교체하고 용액 부피를 2.0 상대부피(64 mL)로 감소시켰다. 용액을 약 25°C까지 냉각시키고, 생성된 고체를 여과로 수집하였다. 고체를 에탄올(1.0 상대부피, 32 mL)로 세척한 후 40°C에서 진공 건조시켜 5-브로모-8-니트로-테트라린-1-온 I13(15.36 g, 40%)을 갈색 고체로서 수득하였다(RT 14.0분).

[1195] **방법 1** 브로모-8-니트로-테트라린-1-온에 대한 IPC, 순도, 및 분석 방법.

기기	Thermo U-3000		
컬럼	ACE Excel 3 C18- PFP(3.0 mm×150 mm)		
오븐	40°C		
이동상	A: 물 중의 10 mM 포름산암모늄(pH 3.5) B: CAN		
구배 프로그램	시간(분)	A%	B%
	0.0 90	10	
	20.0	10	90
	23.0	10	90
	24.0	90	10
	30.0	90	10
	재평형 시간: 6 분		
유속	1.0 ml/분		
검출기	UV 220 nm		
희석제	CAN		

[1196]

[1197] b) N-(8-니트로-1-옥소-테트라린-5-일)아세트아미드(I14)

[1198] 디옥산(15 상대부피, 270 mL) 중의 브로모-8-니트로-테트라린-1-온(I13)(1.0 당량, 18.0 g, 90.6% ww), 아세트아미드(1.2 당량, 4.72 g), 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐(0)(0.01 당량, 0.61 g), 및 인산칼륨(1.4 당량, 19.8 g)의 용액을 질소 하에 약 70°C까지 가열하였다. 반응이 완료된 후 용액을 약 20°C까지 냉각시키고 디옥산(5 상대부피, 90.0 mL)으로 희석하고 여과하였다. 용매를 에탄올로 교체하고 부피를 3 상대부피(54.0 mL)의 총 반응 부피로 감소시켰다. 용액을 약 20°C까지 냉각시키고, 생성된 고체를 여과로 수집하고 MTBE(메틸 tert-부틸 에테르)(1.0 상대부피, 18.0 mL)로 세척하였다. 고체를 40°C에서 진공 건조시켜 N-(8-니트로-1-옥소-테트라린-5-일)아세트아미드 I14(10.0 g, 60.6%)를 암황색 고체로서 수득하였다(RT 8.86분).

[1199] c) N-(8-아미노-1-옥소-테트라린-5-일)아세트아미드(I15)

[1200] 탄소 상의 수산화팔라듐(20% w/w, 0.15 당량, 5.25 g)을 메탄올(40 상대부피, 1250 mL) 중의 N-(8-니트로-1-옥소-테트라린-5-일)아세트아미드(I14)(1.0 당량, 32.6 g)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 약 40°C에서 8시간 동안 약 40 psi의 수소 분위기에 두었다. 수소를 제거하고 질소로 대체하고 촉매를 셀룰로스 상에서 여과로 제거하고, 셀룰로스를 메탄올(4.0 상대부피, 130 mL)로 세척하였다. 용액 부피를 증류를 통해 4.0 상대부피로 감소시킨 후, MTBE(4 상대부피, 130 mL)로 희석하였다. 생성된 고체를 여과로 수집하고, MTBE(2 상대부피, 65 mL)로 세척하고, 40°C에서 진공 건조시켜 N-(8-아미노-1-옥소-테트라린-5-일)아세트아미드 I15(21.1 g, 77.8%)를 회색 고체로서 수득하였다(RT 5.44분).

[1201] d) 5,8-디아미노테트라린-1-온(I16)

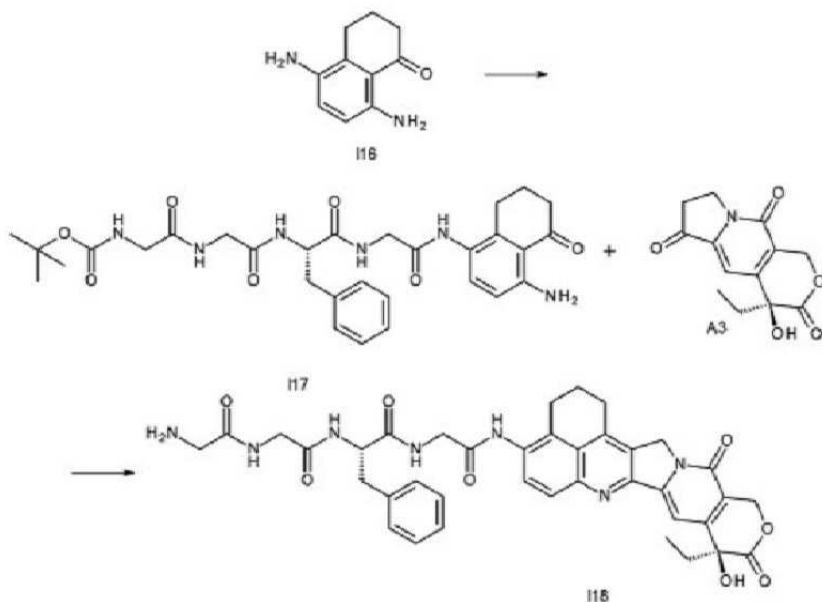
[1202] 염산(5 M, 6.0 상대부피, 60 mL) 중의 N-(8-아미노-1-옥소-테트라린-5-일)아세트아미드(I15)(1.0 당량, 10.0 g)의 용액을 약 90°C에서 3시간 동안 유지하였다. 온도를 25°C로 낮추고, 온도를 25°C로 유지하면서, pH 10.0에 도달할 때까지 수산화나트륨(2 M, 4.0 상대부피, 40 mL)을 첨가하였다. 생성된 고체를 여과로 수집하고 물(2.0 상대부피, 20 mL)로 세척하였다. 습윤 케이크를 테트라하이드로푸란(60 상대부피, 600 mL)에 용해시키고 여과하였다. 용액을 5.0 상대부피로 농축시키고 헵탄(20 상대부피, 200 mL)을 첨가하였다. 용액을 10.0 상대부피로 농축시키고 추가적으로 헵탄(20 상대부피, 200 mL)을 첨가한 후, 부피를 다시 10.0 상대부피로 감소시켰다. 생성된 고체를 여과로 수집하고 헵탄(5.0 상대부피, 50 mL)으로 세척하였다. 고체를 40°C에서 17시간 동안 진공 건조시켜 5,8-디아미노테트라린-1-온(I16)(6.90 g, 82.7%)을 황색 고체로서 수득하였다; ¹H NMR (400 MHz DMSO-d₆) δ ppm 1.82 (m, 2H), 2.38 (t, J=2.0 Hz, 2H), 2.47 (t, J=2.0 Hz, 2H), 6.34 (d, J=2.0 Hz, 1H), 6.68 (d, J=2.0 Hz, 1H); RT 3.90

[1203] e) (S)-4-아미노-9-에틸-9-하이드록시-1,2,3,9,12,15-헥사하이드로-10H,13H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-10,13-디온(I11)

[1204] 톨루엔(50.0 상대부피, 250 mL) 중의 5,8-디아미노테트라린-1-온(I16)(1.0 당량, 5.0 g), (4S)-4-에틸-4-하이드록시-7,8-디하이드로-1H-피라노[3,4-f]인돌리진-3,6,10-트리온(A3)(1.06 당량, 7.9 g), 및 피리디늄 파라-톨루엔설포네이트(1.0 당량, 7.2 g)의 용액을 120°C에서 15시간 동안 유지하였다. 용액의 부피를 2.0 상대부피로 감소시킨 후, 아세트니트릴(20 상대부피, 100 mL) 및 물(20 상대부피, 100 mL)로 희석하였다. 생성된 슬러리를 여과하고 고체를 수성 아세트니트릴(1:1, 20 상대부피, 100 mL)로 세척하였다. 고체를 수성 메탄올(물:MeOH 3:1, 40 상대부피, 200 mL)로 슬러리화하고, 여과하고 수성 메탄올(1:1, 20 상대부피, 100 mL)로 세척하였다.

고체를 50℃에서 물(60 상대부피, 300 mL)로 슬러리화하고, 여과하고 물(10 상대부피, 50 mL)로 세척하였다. 고체를 30℃에서 수성 아세트니트릴(물:아세트니트릴 1:3, 40 상대부피, 200 mL)로 슬러리화하고, 여과하고 수성 아세트니트릴(물:아세트니트릴 1:3, 5 상대부피, 50 mL)로 세척한 후 40℃에서 진공 건조시켜 (S)-4-아미노-9-에틸-9-하이드록시-1,2,3,9,12,15-헥사하이드로-10H,13H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-10,13-디온(**I11**)을 백색 고체(5.0 g, 43.7%)로서 수득하였다(RT 5.13).

[1205] I18의 합성



[1206]

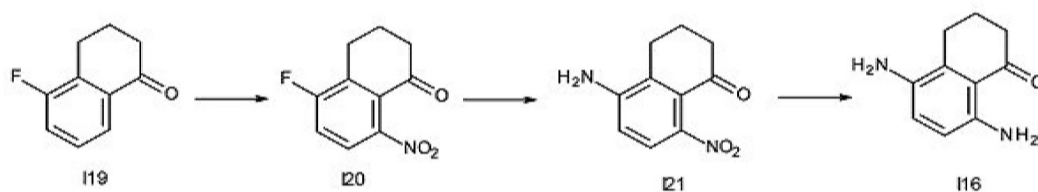
[1207] a) tert-부틸 (S)-2-((2-((1-((2-((4-아미노-5-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아미노)-2-옥소에틸)아미노)-1-옥소-3-페닐프로판-2-일)아미노)-2-옥소에틸)아미노)-2-옥소에틸)카바메이트(**I17**)

[1208] Boc-GGFG-OH(227 mg, 0.52 mmol) 및 EEDQ(157 mg, 0.634 mmol)를 CH₂Cl₂(25 mL)에 용해시키고, 펩티드가 용액이 될 때까지 혼합물을 15분 동안 교반하였다. 이후에, 화합물 **I16**(100 mg, 0.56747 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 완료될 때까지 교반되도록 하였다. 1시간 후, 반응은 LVMC에 의해 90% 완료된 것으로 나타났다. 생성물이 석출되면서 혼합물이 농후해졌다. 혼합물을 1시간 동안 더 방치한 후 진공 건조시켰다. 미정제물을 Et₂O(50 mL)에 용해시켰다. 고체를 여과하고, 이어서 CH₂Cl₂(50 mL)에 용해시켜 추가로 정제하였다. 고체를 여과하고 건조시켜 생성물 **I17**(273 mg, 0.459 mmol, 80.9% 수율)을 회색 고체로서 수득하였다. 분석 데이터: LCMS 3분: ES⁺ = 1.46 분, m/z 595.7 [M + H]⁺.

[1209] b) (S)-2-(2-(2-아미노아세트아미도)아세트아미도)-N-(2-(((S)-9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)아미노)-2-옥소에틸)-3-페닐프로판아미드(**I18**)

[1210] 아닐린 **I17**(450 mg, 1.045 mmol), 락톤 **A5**(280 mg, 1.064 mmol), 및 피리디늄 p-톨루엔설포네이트(273 mg, 1.086 mmol)를 톨루엔(20 mL)에 용해시키고 혼합물을 150℃까지 가열하였다(고환류). 혼합물의 가용화를 돕기 위해 MeOH(4 mL)를 첨가하였다. 7시간 후, 미정제 반응물을 진공 건조시켰다. 미정제 생성물을 실리카겔 크로마토그래피(CHCl₃/MeOH, 100%에서 65:35)로 정제하여 생성물 **I18**(259 mg, 0.359 mmol, 78.1 수율)을 수득하였다. 분석 데이터: LCMS 3분: ES⁺ = 1.17분, m/z 722.8 [M + H]⁺.

[1211] I16의 대체 합성



[1212]

[1213] a) 5-플루오로-8-니트로-테트라린-1-온(I20)

[1214] 5-플루오로테트라린-1-온 **I19**(4.7 g, 29 mmol)를 3구 둥근 바닥 플라스크에서 1/2 양의 황산(120 mL)에 용해시켰다. 모든 고체가 용해될 때까지 혼합물을 교반한 후, 0~5℃까지 냉각시켰다. 적하 깔때기에서, 질산칼륨(3 g, 29.6730 mmol)을 0~5℃에서 나머지 절반의 황산(120 mL)에 용해시켰다. 용액을 차갑게 유지시키면서 SM 혼합물에 천천히 첨가하였다(45분). 완료될 때까지 0~5℃에서 교반하였다. 이후에, 반응 혼합물을 물(250 mL)로 켄칭하고 0~5℃에서 교반되도록 하였다. 고체를 여과하고 물(50 mL)로 세척하였다. 고체를 50℃에서 2시간 동안 진공 오븐에서 건조시켰다. 미정제 고체를 밤새 Et₂O에서 슬러리화시킨 후 0℃까지 냉각시키고 여과하였다. 습윤 케이크를 더 차가운 Et₂O(50 mL)로 세척하고 50℃의 진공 오븐에서 건조시켜 순수한 생성물 **I20**(5.5 g, 26 mmol, 92% 수율)을 연분홍색 미세 분말로써 수득하였다. LCMS (방법 B): ES⁺ = 1.55분, *m/z* 210.1 [M + H]⁺.

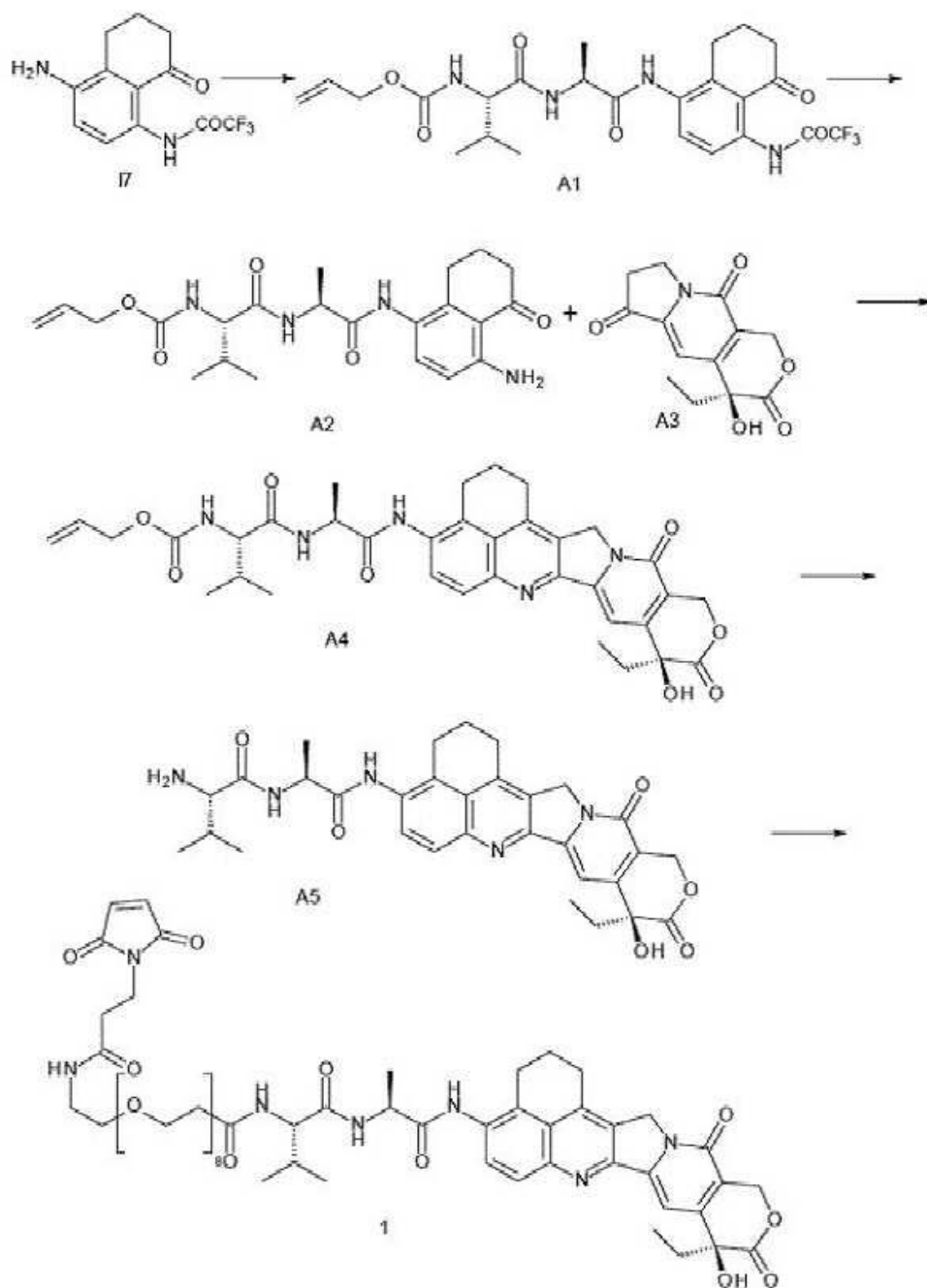
[1215] b) 5-아미노-8-니트로-테트라린-1-온(I21)

[1216] 화합물 **I20**(2.7 g, 13 mmol)을 CH₃CN(2.5 mL)에 용해시키고 H₂O(8 mL, 40 mmol) 중의 NH₄OH(21 질량%)를 밀봉된 내압 튜브에 첨가하고 185℃까지 가열하였다. 완료된 후, 혼합물을 둥근 바닥 플라스크로 옮기고 진공 처리하였다. 미정제물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CHCl₃/MeOH; 100에서 99:1)로 정제하여 순수한 생성물 **I21**(1.1 g, 5.3 mmol, 41% 수율)을 흑색 고체로써 수득하였다. LCMS (방법 B): ES⁺ = 1.34분, *m/z* 207.1 [M + H]⁺.

[1217] c) 5,8-디아미노테트라린-1-온(I16)

[1218] 화합물 **I21**(1.35 g, 6.55 mmol)을 0℃에서 메탄올(20 mL), H₂O(1 mL), 및 포름산(1 mL)의 혼합물에 용해시켰다. 온도를 40℃ 미만으로 유지되도록 하면서 아연(8.5 g, 130 mmol)을 천천히 첨가하였다. 포름산/H₂O(0.5 mL)를 약간 더 첨가하여 반응이 완료되도록 하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 여과액을 EtOAc 및 CH₂Cl₂로 희석한 후 진공 처리하였다. 미정제물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CHCl₃/EtOAc; 100에서 7:3, 이어서 CHCl₃/MeOH; 99:1에서 98:2)에 건조 로딩하여 순수한 생성물 **I16**(1.015 g, 5.760 mmol, 88.0% 수율)을 수득하였다. LCMS (방법 B): ES⁺ = 0.2분, *m/z*는 관찰되지 않음.

[1219] 합성에 1(예를 들어, SG3932의 합성)



[1220]

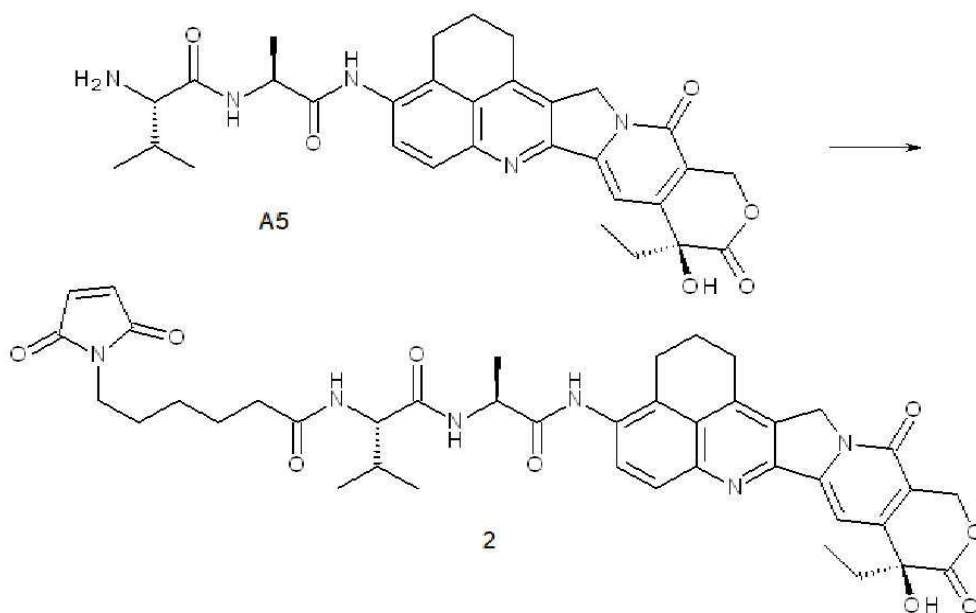
[1221] a) 알릴 ((S)-3-메틸-1-옥소-1-(((S)-1-옥소-1-((5-옥소-4-(2,2,2-트리플루오로아세트아미도)-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아미노)프로판-2-일)아미노)부탄-2-일)카바메이트(A1)

[1222] DCC(6.54 g, 31.7 mmol) 및 HOPO(3.36 g, 30.2 mmol)를 25℃에서 CH₂Cl₂(300 mL) 중의 alloc-Val-Ala-OH(9.09 g, 31.7 mmol) 및 17(7.85 g, 28.8 mmol)의 용액에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 밤새 교반되도록 하였다. 반응 중 형성된 백색 고체를 여과하고 차가운 CH₂Cl₂로 세척하였다. 여과액을 물(150 mL) 및 염수(150 mL)로 세척하였다. 유기층을 MgSO₄로 건조시키고, 여과하고, 증발시켰다. 미정제 생성물을 실리카겔 크로마토그래피(Hex/EtOAc, 60:40)로 정제하였다. 분리된 생성물 A1을 동시용리 DCU로 오염시켰다(21.1 g, 140% 수율). LC/MS(방법 B): ES⁺ = 1.81분, m/z 527.6 [M + H]⁺.

[1223] b) 알릴((S)-1-(((S)-1-((4-아미노-5-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)카바메이트(A2)

- [1224] 보호된 아닐린 **A1**(18 g, 34.19 mmol)을 MeOH와 H₂O 10:1의 혼합물(165 mL)에 용해시키고 K₂CO₃를 첨가하였다(10 g, 72.36 mmol). 혼합물을 완료될 때까지 50℃에서 교반하였다. 혼합물을 거의 건조될 때까지 진공 처리하고 잔류물을 CH₂Cl₂에 용해시키고 H₂O 및 염수로 세척한 후, MgSO₄로 건조시키고, 여과하고 증발시켰다. 미정제 생성물을 실리카겔 크로마토그래피(CHCl₃/MeOH, 100%에서 7:3)로 정제하였다. 분리된 생성물 **A2**를 동시용리 불순물로 오염시켰다(10.71 g, 73% 수율). LC/MS(방법 B): ES⁺ = 1.46분, *m/z* 431.7 [M + H]⁺.
- [1225] c) 알릴 ((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸부탄-2-일)카바메이트(**A4**)
- [1226] 아닐린 **A2**(450 mg, 1.045 mmol), 락톤 **A3**(280 mg, 1.064 mmol), 및 피리디늄 *p*-톨루엔설페이트(273 mg, 1.086 mmol)를 톨루엔(20 mL)에 용해시키고 혼합물을 130℃까지 가열하였다(고환류). 혼합물의 가용화를 돕기 위해 때때로 MeOH 몇 방울을 첨가하였다. 7시간 후, 미정제 반응물을 진공 건조시켰다. 미정제 생성물을 실리카겔 크로마토그래피(CHCl₃/MeOH, 100%에서 95:5)로 정제하여 생성물 **A4**(360 mg, 52.3% 수율)를 수득하였다. LC/MS(방법 B): ES⁺ = 1.51분, *m/z* 658.8 [M + H]⁺.
- [1227] d) 알릴 (S)-2-아미노-N-((S)-1-(((S)-9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)-3-메틸부탄아미드(**A5**)
- [1228] 과량의 피페리딘(642 μL)을 CH₂Cl₂(15 mL) 중의 **A4**(543 mg, 0.82 mmol) 및 PdP(Ph₃)₄(89 mg, 0.08 mmol) 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 20분 동안 교반되도록 하고, 이 시점에서 반응이 완료되었다(LC/MS로 모니터링함). 반응 혼합물을 CH₂Cl₂(25 mL)로 희석하고 유기상을 H₂O(25 mL) 및 염수(25 mL)로 세척하였다. 유기상을 MgSO₄로 건조시키고, 여과하고, 과량의 용매를 감압하에 회전 증발로 제거하여 미정제 생성물 **A5**를 수득하고, 다음 단계에서 그대로 사용하였다. LC/MS(방법 B): ES⁺ = 1.15분, *m/z* 574.6 [M + H]⁺.
- [1229] e) 1-(3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)프로판아미도)-N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)-3,6,9,12,15,18,21,24-옥타옥사헵타코산-27-아미드(**1**)
- [1230] 피리딘(83 μL, 1.03 mmol) 및 Mal-dPEG₈-OTFP(767 mg, 1.03 mmol)를 아르곤 분위기하에서 건조 CH₂Cl₂(50 mL) 중의 미정제 **A5**(1.03 mmol로 추정)의 용액에 첨가하였다. 반응물을 밤새 교반하고, 반응이 불완전하여 반응이 완료되도록 Mal-dPEG₈-OTFP(0.5 당량)를 첨가하였다. 반응물을 CH₂Cl₂(25 mL)로 희석하고 유기상을 H₂O(2 x 50 mL) 및 염수로 세척한 후, MgSO₄로 건조시키고, 여과하고 과량의 용매를 감압하에 회전 증발로 제거하였다. 미정제물을 역상 HPLC(H₂O/CH₃CN +0.05% FA의 구배)로 정제하고 동결건조하여 **1**(1.189 g, 2단계에 걸쳐 31% 수율)을 수득하였다. LC/MS(방법 B): ES⁺ =1.43분, *m/z* 1149.3 [M + H]⁺. LC/MS(방법 C): ES⁺ =5.37분, *m/z* 1149.4 [M + H]⁺.

[1231] 합성예 2(예를 들어, SG4010의 합성)

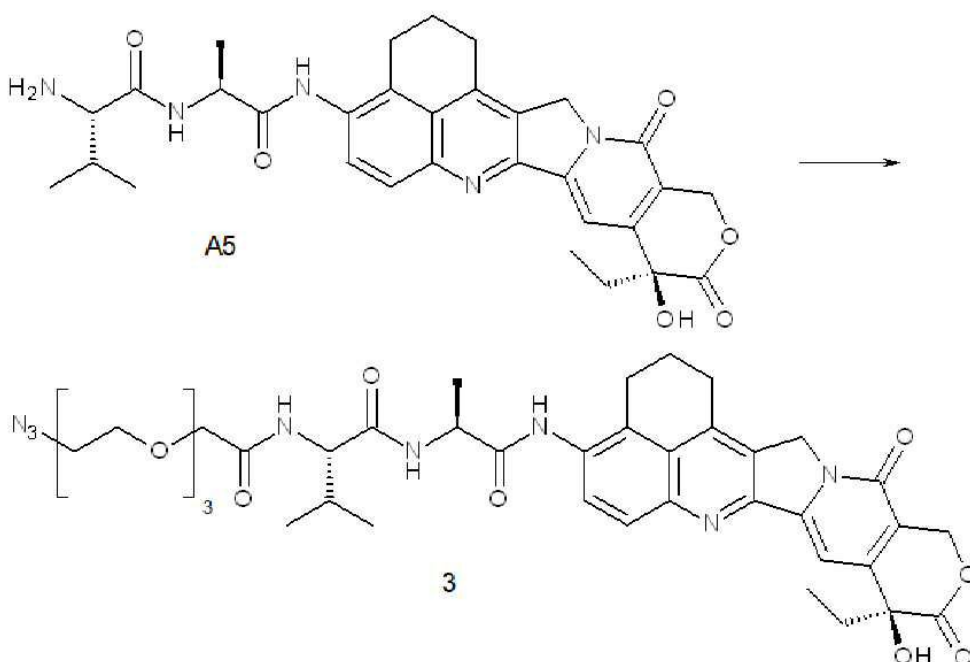


[1232]

[1233] 6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)헥산아미드(2)

[1234] Mal-카프로산(56 mg, 0.26 mmol) 및 EDCI.HCl(51 mg, 0.26 mmol)을 아르곤 분위기하에서 건조 CH_2Cl_2 (20 mL) 중의 미정제 A5(0.26 mmol로 추정)의 용액에 첨가하였다. 반응물을 밤새 교반하고, 반응이 불완전하여 0.5 당량의 Mal-카프로산 및 EDCI.HCl을 더 첨가하였다. 반응물을 CH_2Cl_2 (25 mL)로 희석하고 유기상을 H_2O (2 x 50 mL) 및 염수로 세척한 후, MgSO_4 로 건조시키고, 여과하고 과량의 용매를 감압하에 회전 증발로 제거하였다. 미정제물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5)로 정제하여 2(31.6 mg, 2단계에 걸쳐 20% 수율)를 수득하였다. LC/MS(방법 B): $\text{ES}^+ = 1.56$ 분, m/z 767.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$. LC/MS(방법 C) 15분: $\text{ES}^+ = 6.05$ 분, m/z 767.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

[1235] 합성예 3

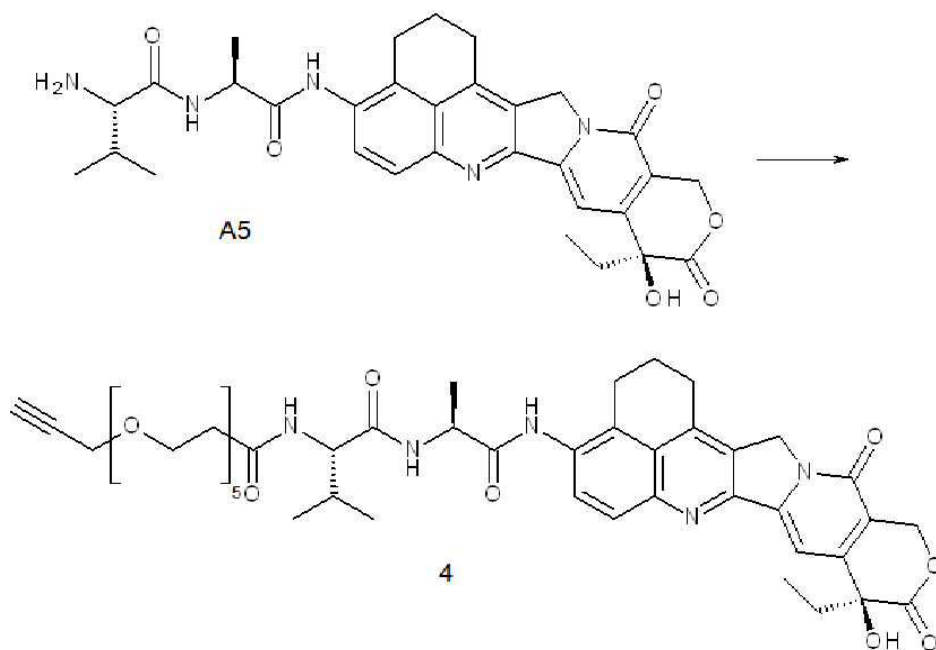


[1236]

[1237] (S)-2-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)아세트아미도)-N-((S)-1-(((S)-9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)-3-메틸부탄아미드(3)

[1238] 아지도-dPEG₃-산(77.5 mg, 0.31 mmol) 및 EDCI.HCl(60 mg, 0.31 mmol)을 아르곤 분위기하에서 건조 CH₂Cl₂(20 mL) 중의 미정제 A5(0.31 mmol로 추정)의 용액에 첨가하였다. 반응물을 밤새 교반하고, 반응이 불완전하여 0.5 당량의 아지도-dPEG₃-OH 및 EDCI.HCl을 더 첨가하였다. 반응물을 CH₂Cl₂(25 mL)로 희석하고 유기상을 H₂O(2 x 50 mL) 및 염수로 세척한 후, MgSO₄로 건조시키고, 여과하고 과량의 용매를 감압하에 회전 증발로 제거하였다. 미정제물을 분취 HPLC로 정제하고 분획을 동결건조하여 순수한 3(92.2 mg, 2단계에 걸쳐 24.7% 수율)을 수득하였다. LC/MS(방법 B): ES⁺ = 1.69분, m/z 789.9 [M + H]⁺. LC/MS(방법 C): ES⁺ = 6.68분, m/z 790.0 [M + H]⁺.

[1239] 합성예 4

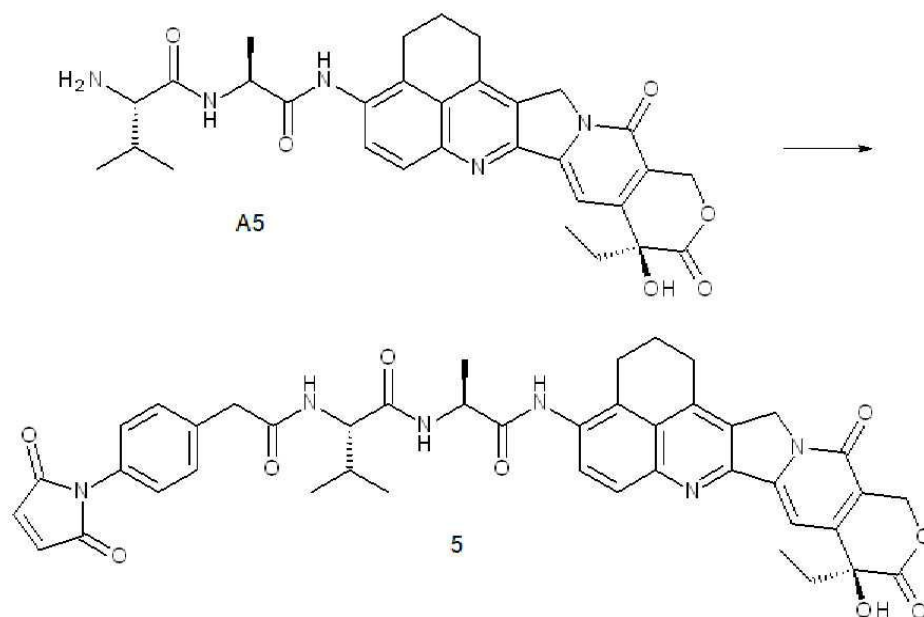


[1240]

[1241] N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)-4,7,10,13,16-펜타옥사노나데크-18-인아미드(4)

[1242] 프로파길-dPEG₅-산(56 mg, 0.19 mmol) 및 EDCI.HCl(37 mg, 0.19 mmol)을 아르곤 분위기하에서 건조 CH₂Cl₂(10 mL) 중의 미정제 A5(0.19 mmol로 추정)의 용액에 첨가하였다. 반응물을 밤새 교반하고, 반응이 불완전하여 0.5 당량의 프로파길-dPEG₅-OH 및 EDCI.HCl을 더 첨가하였다. 반응물을 CH₂Cl₂(25 mL)로 희석하고 유기상을 H₂O(2 x 50 mL) 및 염수로 세척한 후, MgSO₄로 건조시키고, 여과하고 과량의 용매를 감압하에 회전 증발로 제거하였다. 미정제물을 분취 HPLC로 정제하고 분획을 동결건조하여 순수한 4(22 mg, 2단계에 걸쳐 16.7% 수율)을 수득하였다. LC/MS(방법 B): ES⁺ = 1.54분, m/z 860.9 [M + H]⁺. LCMS(방법 C): ES⁺ = 5.57분, m/z 860.9 [M + H]⁺.

[1243] 합성예 5



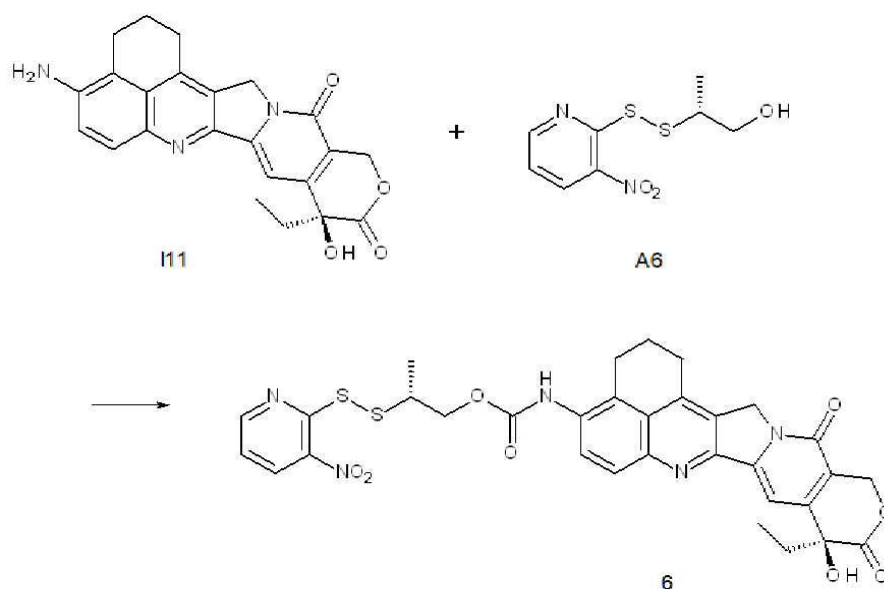
[1244]

[1245] (S)-2-(2-(4-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)페닐)아세트아미도)-N-((S)-1-(((S)-9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)-3-메틸부탄아미드(5)

[1246]

PM-아세트산-OSu(64 mg, 0.19 mmol)를 아르곤 분위기하에서 건조 CH_2Cl_2 (10 mL) 중의 미정제 **A5**(0.19 mmol로 추정)의 용액에 첨가하였다. 반응이 진행되지 않아 DIPEA(51 μL , 0.28 mmol)를 첨가하였다. 반응이 완료될 때까지 교반하였다. 혼합물을 CH_2Cl_2 (25 mL)로 희석하고 유기상을 H_2O (2 x 50 mL) 및 염수로 세척한 후, MgSO_4 로 건조시키고, 여과하고 과량의 용매를 감압하에 회전 증발로 제거하였다. 미정제물을 분취 HPLC로 정제하고 분획을 동결건조하여 순수한 **5**(2.5 mg, 2단계에 걸쳐 1.6% 수율)을 수득하였다. LC/MS(방법 B): $\text{ES}^+ = 1.54$ 분, m/z 787.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$. LC/MS(방법 C): $\text{ES}^+ = 5.61$ 분, m/z 787.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

[1247] 합성예 6



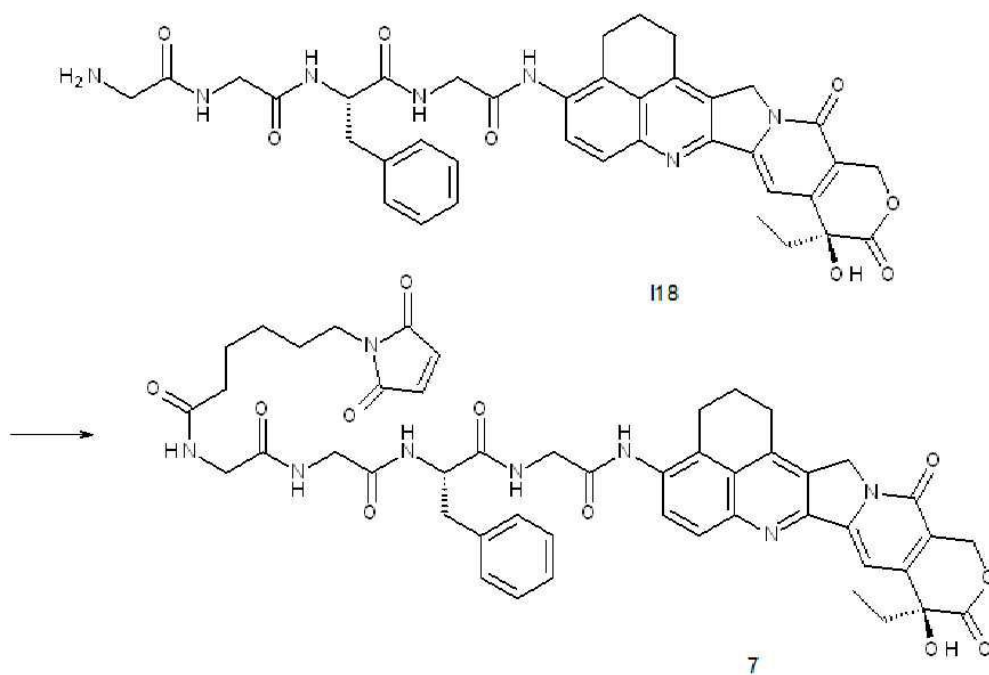
[1248]

[1249] (R)-2-((3-니트로피리딘-2-일)디설파닐)프로필((S)-9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)카바메이트(6)

[1250] (i) (2R)-2-[(3-니트로-2-피리딜)디설파닐]프로판-1-올 **A6**(25 mg, 0.1015 mmol, 1.0 당량)을 디클로로메탄(1 mL)에 용해시켰다. 피리딘(8.5 μ L, 0.11 mmol, 1.0 당량)에 이어 트리포스젠(11 mg, 0.0370685 mmol, 0.33 당량)을 첨가하고 혼합물을 Ar 하에서 45분 동안 교반한 결과, LCMS(Et_2NH 웬칭)는 상응하는 카바메이트의 형성을 나타냈다.

[1251] (ii) (S)-4-아미노-9-에틸-9-하이드록시-1,2,3,9,12,15-헥사하이드로-10H,13H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-10,13-디온(**I11**)(43 mg, 0.09026 mmol, 1.0 당량)을 디클로로메탄(2 mL), *N,N*-디이소프로필에틸아민(42 μ L, 0.241 mmol, 2.7 당량), 및 피리딘(25 μ L, 0.309 mmol, 3.4 당량)에 용해시켰다. 단계 (i)의 반응 혼합물을 첨가하고 혼합물을 30분 동안 교반한 결과, LCMS는 반응이 완료되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 진공 농축하고 isolera 크로마토그래피(CH_2Cl_2 중의 0~4% MeOH)로 정제하여 **6**(22 mg, 0.03256 mmol, 36% 수율, QC = 96.8%)을 황색 고체로서 수득하였다. LC/MS(방법 B): RT = 1.86분, 676.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[1252] 합성에 7(예를 들어, SG4052의 합성)

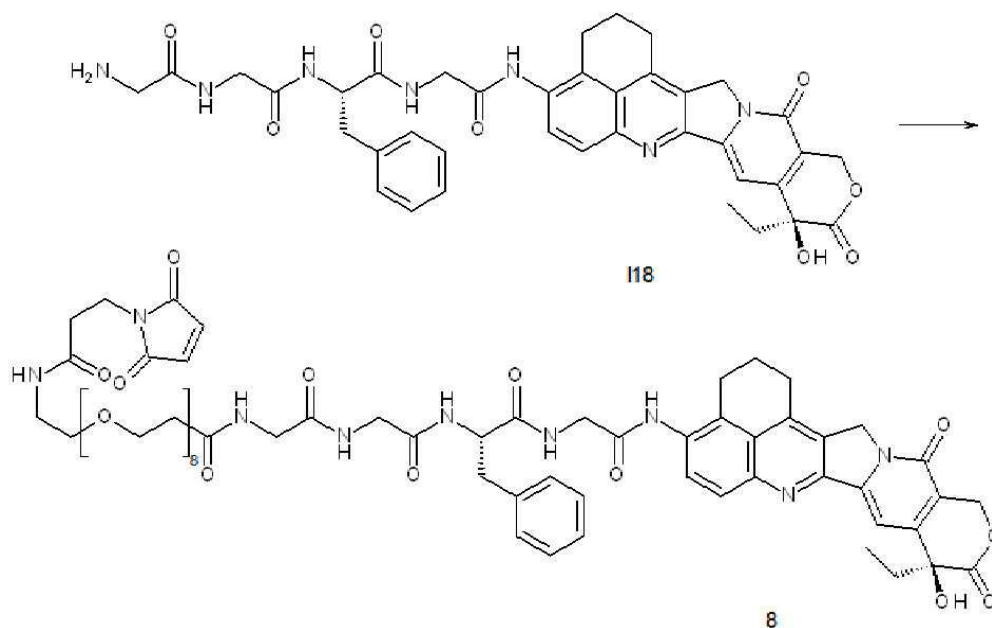


[1253]

[1254] 6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-N-(2-((2-(((S)-1-((2-(((S)-9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)아미노)-2-옥소에틸)아미노)-1-옥소-3-페닐프로판-2-일)아미노)-2-옥소에틸)아미노)-2-옥소에틸)헥산아미드(**7**)

[1255] 화합물 **I18**(259 mg, 0.3588 mmol)을 CH_2Cl_2 (25 mL)에 용해시켰다. 출발 물질이 전혀 용해되지 않아 DMA(1 mL)를 첨가하였다. 개선이 관찰되지 않았기 때문에 DIPEA(68 μ L, 0.390 mmol)를 첨가해서 모든 고체가 용해되었다. 말레이미드 카프로산(69 mg, 0.358 mmol)을 첨가하고 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 한 결과, LCMS 분석은 반응이 완료되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 MeOH(2 mL)로 웬칭하고 진공 건조시켰다. 미정제 생성물을 분취 HPLC로 정제한 이후에 동결건조하여 화합물 **7**을 황토색 고체(38.2 mg, 11% 수율)로서 수득하였다. 분석 데이터: LCMS 3분: $\text{ES}^+ = 1.47$ 분, m/z 916.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$ LCMS 15분: $\text{ES}^+ = 5.46$ 분, m/z 916.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

[1256] 합성예 8(예를 들어, SG4057의 합성)



[1257]

[1258] 1-(3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)프로판아미도)-N-(2-((2-(((S)-1-((2-(((S)-9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)아미노)-2-옥소에틸)아미노)-1-옥소-3-페닐프로판-2-일)아미노)-2-옥소에틸)아미노)-2-옥소에틸)-3,6,9,12,15,18,21,24-옥타옥사헵타코산-27-아미드(8)

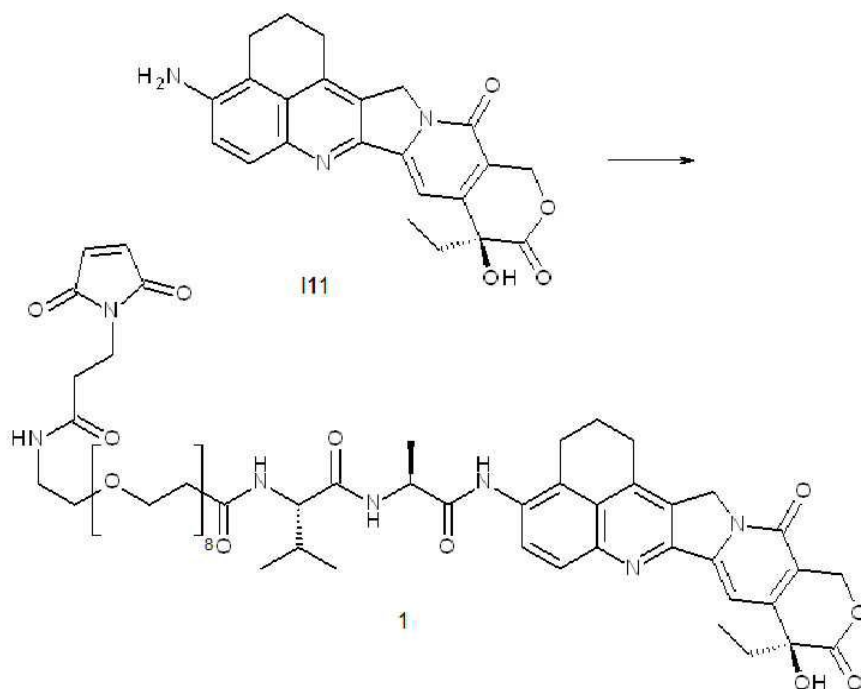
[1259]

화합물 **118**(70 mg, 0.096 mmol)을 CH_2Cl_2 (5 mL)에 용해시켰다. 출발 물질이 전혀 용해되지 않아 DMA(0.5 mL)를 첨가하였다. 개선이 관찰되지 않았기 때문에 DIPEA(19 μL , 0.106 mmol)를 첨가해서 모든 고체가 용해되었다. Mal-dPEG₈-OH(63 mg, 0.106 mmol) 및 EDCI.HCl(19 mg, 0.099 mmol)을 첨가하고 혼합물을 실온에서 밤새 교반되도록 한 결과, LCMS 분석은 반응이 완료되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 MeOH(2 mL)로 퀀칭하고 진공 건조시켰다. 미정제 생성물을 분취 HPLC로 정제한 이후에 동결건조하여 **8**을 황토색 고체(30 mg, 24% 수율)로서 수득하였다. LCMS 3분: $\text{ES}^+ = 1.44$ 분, m/z 1297.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

[1260]

합성예 9 - 1의 대체 합성

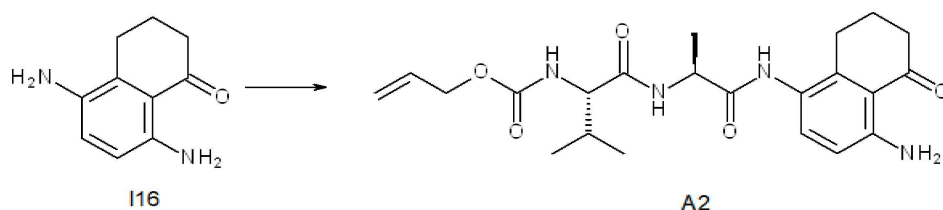
[1261] (예를 들어, SG3932의 대체 합성)



[1262]

[1263] (S)-4-아미노-9-에틸-9-하이드록시-1,2,3,9,12,15-헥사하이드로-10H,13H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-10,13-디온 **I11** (371 mg, 0.779 mmol, 1.0 당량)을 디클로로메탄(30 mL)에 용해시켰다. *N,N*-디메틸아세트아미드(10 mL) 중의 *N,N*-디이소프로필에틸아민(69 μ L, 0.396 mmol, 0.51 당량), 및 (2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-디옥소피롤-1-일)프로파노일아미노]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]프로파노일아미노]-3-메틸-부타노일]아미노]프로판산(664 mg, 0.871 mmol, 1.1 당량)을 첨가한 후, EDCI.HCl(226 mg, 1.18 mmol, 1.5 당량)을 첨가하고 혼합물을 2시간 동안 교반한 결과, LCMS는 양호한 전환을 나타냈지만 반응은 멈춘 것으로 나타났다. 반응 혼합물을 30 $^{\circ}$ C로 가온하고 30분 동안 교반하였고, LCMS는 변화가 없음을 나타내어 CH_2Cl_2 를 진공 제거하고 Et_2O 를 생성된 DMA 용액에 첨가하였다. 침전된 오일을 수집하고 Et_2O 를 진공 제거하고 침전 과정을 반복하였다. 합한 침전물을 HPLC(13분에 걸쳐 A 중의 10~60% B)로 정제하여 **1** (200 mg, 0.174 mmol, 98% 순도, 22% 수율)을 동결건조 후 황색 잔류물로서 수득하였다. LC/MS (방법 A): 체류 시간 1.44분(ES+) m/z 1149 [$M + H$] $^{+1}$ ^1H NMR (600 MHz, 클로로포름-*d*) δ 8.81 (s, 1H), 7.83 (s, 2H), 7.48 (s, 1H), 7.18 (dd, $J = 18.7, 7.5$ Hz, 2H), 6.69 (s, 2H), 6.43 (s, 1H), 5.68 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 5.27 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 5.03 (d, $J = 18.4$ Hz, 1H), 4.90 (d, $J = 18.4$ Hz, 1H), 4.75 (p, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.32 (dd, $J = 7.4, 5.8$ Hz, 1H), 4.05 (s, 1H), 3.83 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 3.78 - 3.68 (m, 3H), 3.68 - 3.57 (m, 31H), 3.53 (t, $J = 5.1$ Hz, 3H), 3.40 (q, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.06 - 2.91 (m, 3H), 2.84 (dt, $J = 16.3, 6.2$ Hz, 1H), 2.63 (ddd, $J = 14.8, 8.5, 4.2$ Hz, 1H), 2.57 - 2.44 (m, 4H), 2.30 (dq, $J = 13.4, 6.7$ Hz, 1H), 2.10 (p, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.91 (ddt, $J = 16.8, 14.3, 7.2$ Hz, 3H), 1.54 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.02 (dd, $J = 15.5, 6.9$ Hz, 10H).

[1264] 합성예 10 - A2의 대체 합성

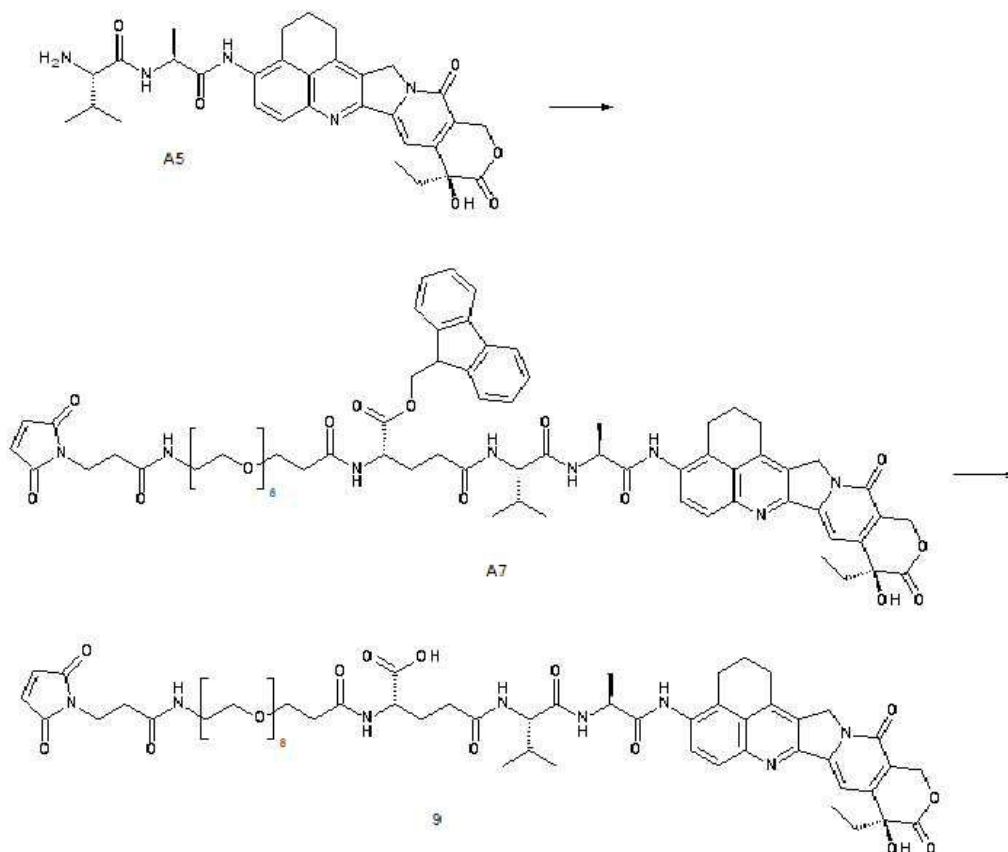


[1265]

[1266] 알릴 ((S)-1-(((S)-1-((4-아미노-5-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로나프탈렌-1-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)카바메이트(**A2**)

[1267] EDCI.HCl(7.71 g, 31.2 mmol)을 CH₂Cl₂(200 mL) 중의 alloc-Val-Ala-OH(8.49 g, 31.2 mmol)의 용액에 첨가하고, 15분 동안 또는 용해될 때까지 교반하였다. 이후에, **I16**(5 g, 28.3 mmol)을 첨가하고, 생성된 혼합물을 반응이 완료될 때까지 교반되도록 하였다. 휘발물을 감압하에 제거하였다. 미정제 생성물을 Et₂O(50 mL)에 용해시키고 혼합물을 3분 동안 초음파 처리하였다. 고체를 여과하고 CH₂Cl₂(50 mL)에 다시 용해시키고, 3분 동안 초음파 처리하고 다시 여과하여 순수한 생성물 **A2**를 회색 고체(12.21 g, 79% 수율)로서 수득하였다. LC/MS (방법 B): ES⁺ = 1.47분, *m/z* 431.5 [M + H]⁺.

[1268] 합성예 11



[1269]

[1270] a) (9H-플루오렌-9-일)메틸 N2-(1-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-3-옥소-7,10,13,16,19,22,25,28-옥타옥사-4-아자헨트리아콘탄-31-오일)-N5-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)-L-글루탐미네이트(A7)

[1271] EDCI.HCl(0.10 mmol, 1.2 당량)을 DCM(5 mL) 중의 **A5**(0.087 mmol, 1.0 당량) 및 Mal-PEG₈-Glu-OH(0.10 mmol, 1.2 당량)의 용액에 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 증발 건조시키고 컬럼(8~12% MeOH/DCM)으로 정제하여 생성물을 백색 고체로 남겼다. 수율 = 80 mg(63%). LC/MS (방법 B) rt 1.66 분 *m/z* (1456.2) M+H.

[1272] b) N2-(1-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-3-옥소-7,10,13,16,19,22,25,28-옥타옥사-4-아자헨트리아콘탄-31-오일)-N5-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-에틸-9-하이드록시-10,13-디옥소-2,3,9,10,13,15-헥사하이드로-1H,12H-벤조[de]피라노[3',4':6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-4-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)-L-글루타민(9)

[1273] 1-메틸피롤리딘(200 μL)을 DMF(0.8 mL) 중의 **A7**(0.06 mmol)의 용액에 첨가하고 실온에서 10분 동안 교반하였다. 용매를 진공 제거하고 잔류물을 분취 HPLC(8.5분에 걸쳐서 30% MeCN/물 + 0.05% 포름산)로 정제하였다. 생성물을 함유하는 분획을 동결건조시켜 생성물을 미색 고체로서 수득하였다. 수율 = 23 mg(30%). LC/MS (방법 B) rt 1.43분 *m/z* (1278.4) M+H.

[1274] 상기 명세서에 언급된 모든 간행물은 본원에 참조로 포함된다. 본 발명의 기재된 방법 및 시스템의 다양한 변경 및 변화가 본 발명의 범주 및 사상으로부터 벗어나지 않으면서 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명을 특정 바람직한 실시 형태와 관련하여 설명하였지만, 청구된 바와 같은 본 발명은 그러한 특정 실시 형태에 과도하게 한정되어서는 안 된다는 것을 이해해야 한다. 실제로, 생화학 및 생명공학 또는 관련 분야의 숙련자에게 자명한 본 발명을 수행하기 위한 기재된 모드의 다양한 변경은 하기 청구범위의 범주 내에 있는 것으로 의도된다.

[1275] 서열

식별자	서열
ZYUEPQ-E02; CHDR1	서열번호 1: GYYWN
ZYUEPQ-E02; CHDR2	서열번호 2: EINHSGSTNYPNPSLKS
ZYUEPQ-E02; CHDR3	서열번호 3: NLYNWNLD
ZYUEPQ-E02; CLDR1	서열번호 4: RASQGIKNDLG
ZYUEPQ-E02; CLDR2	서열번호 5: VASSLQS
ZYUEPQ-E02; CLDR3	서열번호 6: LQHNSYPRT
ZYOEQD-E02; CHDR1	서열번호 7: GYYWN
ZYOEQD-E02; CHDR2	서열번호 8: EINHSGSTSYNPSLKS
ZYOEQD-E02; CHDR3	서열번호 9: VLYNWNVDS
ZYOEQD-E02; CLDR1	서열번호 10: RASQDIRNDWG
ZYOEQD-E02; CLDR2	서열번호 11: AASRLQS
ZYOEQD-E02; CLDR3	서열번호 12: LQHNSYPRT
ZYOE0B-F05; CHDR1	서열번호 13: SGGYYWS
ZYOE0B-F05; CHDR2	서열번호 14: NIYYSGSTYYNPSLKS
ZYOE0B-F05; CHDR3	서열번호 15: EKALATVTPSGYENYYTVDV
ZYOE0B-F05; CLDR1	서열번호 16: WASQGISSYLA
ZYOE0B-F05; CLDR2	서열번호 17: AASTLQS
ZYOE0B-F05; CLDR3	서열번호 18: QHLNSYPLT
ZYOE05-E07; CHDR1	서열번호 19: SGGYYWS
ZYOE05-E07; CHDR2	서열번호 20: NIYYSGSTYYNPSLKS
ZYOE05-E07; CHDR3	서열번호 21: EKALASVIPS GYENYYVVDV
ZYOE05-E07; CLDR1	서열번호 22: WASQGIAGYLA
ZYOE05-E07; CLDR2	서열번호 23: AASTLQS
ZYOE05-E07; CLDR3	서열번호 24: QHLNSYPLT
ZYOEPO-C07; CHDR1	서열번호 25: DYYMS
ZYOEPO-C07; CHDR2	서열번호 26: YISSSGSTIYYTDSVKG
ZYOEPO-C07; CHDR3	서열번호 27: DGVGFDV
ZYOEPO-C07; CLDR1	서열번호 28: RASQSVSSSYLA
ZYOEPO-C07; CLDR2	서열번호 29: AASSRAT
ZYOEPO-C07; CLDR3	서열번호 30: QQYGSSPLYT

[1276]

[1277] 서열번호 31 (ZYUEPQ-E02, 가변 중쇄)
 QQVLQWQWAGLLKPSETLSLTCAVYGGFSFGYYWNWIRPPGKLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTVILVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARNLYNW
 NLDSWGQGTILVTSS

[1278] 서열번호 32 (ZYUEPQ-E02, 가변 경쇄)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIKNDLGWYQKPGKAPKRLIYVASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGT
 KVEIK

[1279] 서열번호 33 (ZYOEQD-E02, 가변 중쇄, 예를 들어, 생식세포화 전)
 QQVLQWQWAGLLKPSETLSLTCAVYGGFSFGYYWNWIRPPGKLEWIGEINHSGSTSYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARVLYNW
 NVDSWGQGTILVTSS

[1280] 서열번호 34 (ZYOEQD-E02, 가변 경쇄)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNDVGWYQKPGKAPKRLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGT
 KVEIK

- [1281] 서열번호 35 (ZY0E0B-F05, 가변 중쇄)
- [1282] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNSTAAADTAVYYCATEKA
LATVTPSGYENYYTVDVWGQGTITVTVSS
- [1283] 서열번호 36 (ZY0E0B-F05, 가변 경쇄)
DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPKGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHLNSYPLTFGGGT
KVEIK
- [1284] 서열번호 37 (ZY0E05-E07, 가변 중쇄)
QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGNIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNSTAAADTAVYYCAREKA
LASVIPSGYENYYVVDVWGQGTITVTVSS
- [1285] 서열번호 38 (ZY0E05-E07, 가변 경쇄)
DIQLTQSPSFLSASVGGRVTITCWASQGIAGYLAWYQQKPKGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHLNSYPLTFGGGT
KVEIK
- [1286] 서열번호 39: (ZY0EP0-C07, 가변 중쇄)
QVQLVESGGVLVKPGSLRLSCAASGFTLSDYYMSWIRQAPGMGLEWVSYISSSGSTIYYTDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGVG
FDYWGQGTITVTVSS
- [1287] 서열번호 40 (ZY0EP0-C07, 가변 경쇄)
EIVLTQSPGTLSTLPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQSPRLLIYAASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFATYYCQYGSPLYTFGQ
GTKLEIK
- [1288] 서열번호 41 (Maia 중쇄 불변 영역, 시스템인 삽입에 밑줄 표시):
- [1289] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CDKTHITCPPCPAPPELLGGPSCFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [1290] 서열번호 42 (경쇄 불변 영역)
- [1291] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC
- [1292] 서열번호 43 (ZY0EQD-E02, 가변 중쇄, 예를 들어, 생식세포화 전, 예를 들어, 서열번호 33/서열번호 45의 변이
체)
QVQLQQWAGLLKPSETLSLTCTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTSYNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKLNSTAAADTAVYYCARVLYNW
NVDSWGQGTITVTVSS
- [1293] 서열번호 44 (ZY0EQD-E02, 경쇄):
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDVGWYQQKPKGKAPKRLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSTYPRTFGGGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC
- [1294] 서열번호 45 (EQD-E02_GL, 가변 중쇄, GL = 생식세포화됨)
- [1295] QVQLQQWAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNSTAAADTAVYYCARVLYNW
NVDSWGQGTITVTVSS
- [1296] 서열번호 46 (EQD-E02-GLY, 가변 중쇄, GLY = 생식세포화됨 + Y 치환)
- [1297] QVQLQQWAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIQHSGSTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNSTAAADTAVYYCARVLYNW
NVDSWGQGTITVTVSS
- [1298] 서열번호 47 (EQD-E02-GLQ, 가변 중쇄, GLQ = 생식세포화됨 + Q 치환)
- [1299] QVQLQQWAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIQHSGSTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNSTAAADTAVYYCARVLYNW
NVDSWGQGTITVTVSS

[1300] 서열번호 48 (E02-GL-Maia-중쇄, 시스테인 삽입에 밑줄 표시)

[1301] QVQLQQWAGLLKPSETLSACTVYGGFSFGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARVLYNW
NVDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSCVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

[1302] 서열번호 49 (E02-GLY-Maia-중쇄, GLY = 생식세포화됨 + Y 치환)

[1303] QVQLQQWAGLLKPSETLSACTVYGGFSFGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIHSGSTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARVLYNW
NVDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSCVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

[1304] 서열번호 50 (E02-GLQ-Maia-중쇄, GLQ = 생식세포화됨 + Q 치환)

[1305] QVQLQQWAGLLKPSETLSACTVYGGFSFGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIQHSGSTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARVLYNW
NVDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSCVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

[1306] 서열번호 51 (E02-GL-WT-중쇄)

[1307] QVQLQQWAGLLKPSETLSACTVYGGFSFGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARVLYNW
NVDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

[1308] 서열번호 52 (중쇄 불변 영역)

[1309] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSCVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCFSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

[1310] 서열번호 53 (인간 B7H4 핵산 서열, 5' 및 3' UTR 포함)

[1311] GCCACCatggcttcctggggcagatcctcttctggagcataattagcatcatcattattctggctggagcaattgcactcatcattggctttgggtatttca
gggagacactccatcacagtactactgtcgccctcagctgggaacattggggaggatggaatcctgagctgcacttttgaacctgacatcaaaatttctgat
atcgtgatacaatggctgaaggaaggtgttttaggcttggtccatgagttcaagaaggcaaatgagctgtcggagcaggatgaaatgttcagaggccgg
acagcagtggtttgctgatcaagtgatagttggcaatgcctctttcgcgctgaaaaacgtgcaactcacagatgctggcacctacaaatgtatatcatcact
tctaaaggcaagggaatgctaaccttgagtataaaactggagccttcagcatgccggaagtgaatgtggactataatgccagctcagagaccttgcggtgt
gaggctccccgatggttccccgacccacagtggctgggcatcccaagtggaccaggagccaacttctcggaagtctccaataccagctttgagctgaac
tctgagaatgtaccatgaaggttgtgtctgtctctacaatgttacgatacaacaacataactcctgtatgattgaaaatgacattgccaaagcaacagg
gatatacaagtacagaatcggagatcaaaaggcggagtcacctacagctgctaaactcaaaggcttctctgtgtgtctcttcttctttgccatcagctgg
gcacttctgcctctcagcccttacctgatgctaaaaTAATAA

[1312] 서열번호 54 (인간 B7H4 핵산 서열, 암호화 서열)

[1313] atggcttcctggggcagatcctcttctggagcataattagcatcatcattattctggctggagcaattgcactcatcattggctttgggtatttcagggaga
cactccatcacagtactactgtcgccctcagctgggaacattggggaggatggaatcctgagctgcacttttgaacctgacatcaaaatttctgatcgtg
atacaatggctgaaggaaggtgttttaggcttggtccatgagttcaagaaggcaaatgagctgtcggagcaggatgaaatgttcagaggccggacagca
gtgtttgctgatcaagtgatagttggcaatgcctctttcgcgctgaaaaacgtgcaactcacagatgctggcacctacaaatgtatatcatcacttctaaa
ggcaagggaatgctaaccttgagtataaaactggagccttcagcatgccggaagtgaatgtggactataatgccagctcagagaccttgcggtgtgaggct

ccccgatggttccccagcccacagtgggtctgggcatcccaagttgaccaggagccaacttctcggaagtctccaataccagctttgagctgaactctgag
aatgtgaccatgaaggttgtgtctgtgctctacaatgttacgatcaacaacacatactcctgtatgattgaaaatgacattgccaaagcaacaggggatatc
aaagtgacagaatcggagatcaaaaggcggagtcacctacagctgctaaactcaaaggcttctctgtgtgtctcttcttttcccatcagctgggcactt
ctgcctctcagcccttacctgatgctaaaa

[1314] 서열번호 55 (인간 B7H4 폴리펩티드 서열; UniProt 수탁번호: Q7Z7D3)

[1315] MASLGQILFWSIIISIIILAGAIALIIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTA
VFADQVIVGNASRLRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKKGKGNANLEYKTGAFSMPENVNDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSE
NVTMKVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTESI KRRSHLQLLSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK

[1316] 실시 형태

[1317] E1. 다음을 포함하는 B7-H4에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

[1318] i. 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포
함하는 중쇄 CDR1(HCDR1), 중쇄 CDR2(HCDR2), 중쇄 CDR3(HCDR3), 경쇄 CDR1(LCDR1), 경쇄 CDR2(LCDR2) 및 경쇄
CDR3(LCDR3), 또는 이의 기능적 변이체;

[1319] ii. 각각 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포
함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;

[1320] iii. 각각 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18의 아미노산 서
열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체;

[1321] iv. 각각 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 아미노산 서
열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체; 또는

[1322] v. 각각 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 및 서열번호 30의 아미노산 서
열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체.

[1323] E2. E1에 있어서, 다음을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

[1324] i. 각각 서열번호 45 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL), 또는 이의
기능적 변이체;

[1325] ii. 각각 서열번호 33 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL), 또는 이의
기능적 변이체;

[1326] iii. 각각 서열번호 43 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL), 또는 이
의 기능적 변이체;

[1327] iv. 각각 서열번호 46 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL), 또는 이의
기능적 변이체;

[1328] v. 각각 서열번호 47 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL), 또는 이의
기능적 변이체;

[1329] vi. 각각 서열번호 31 및 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체;

[1330] vii. 각각 서열번호 35 및 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체;

[1331] viii. 각각 서열번호 37 및 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체; 또는

[1332] ix. 각각 서열번호 39 및 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체.

[1333] E3. E1 또는 E2에 있어서, 다음을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

[1334] i. 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포
함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 이의 기능적 변이체.

[1335] E4. E1 내지 E3에 있어서, 다음을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

[1336] i. 각각 서열번호 45 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL, 또는 이의 기능적 변이체.

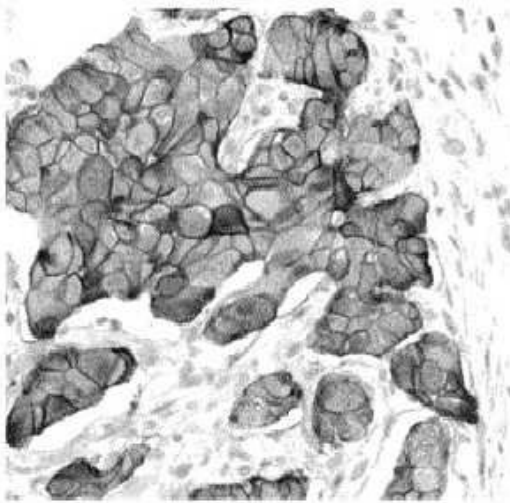
- [1337] E5. E1 내지 E4에 있어서, OVCAR4 세포주와 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1338] E6. E1 내지 E5에 있어서, 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1339] E7. E1 내지 E5에 있어서, 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1340] E8. E1 내지 E7에 있어서, 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1341] E9. E1 내지 E5 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1342] E10. E1 내지 E5 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1343] E11. E1 내지 E10 중 어느 하나에 있어서, 이중 작용제에 접합되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1344] E12. E1 내지 E11 중 어느 하나에 있어서, 토포이소머라제 I 억제제, 튜블라이신 유도제, 피롤로벤조디아제핀, 항미생물제, 치료제, 전구약물, 펩티드, 단백질, 효소, 지질, 생물학적 반응 개질제, 약제, 림포카인, 이중 항체, 이중 항체의 단편, 검출 가능한 표지, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 방사성 동위원소 또는 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 이중 작용제에 접합되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1345] E13. E1 내지 E12 중 어느 하나에 있어서, 토포이소머라제 I 억제제, 튜블라이신 유도제, 피롤로벤조디아제핀 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 하나 이상의 이중 작용제에 접합되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1346] E14. E1 내지 E13 중 어느 하나에 있어서, 튜블라이신 AZ1508, 피롤로벤조디아제핀 SG3315, 피롤로벤조디아제핀 SG3249, 또는 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 이중 작용제에 접합되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1347] E15. E1 내지 E14 중 어느 하나에 있어서, 피롤로벤조디아제핀 SG3249 세포독소: (SG3249)에 접합되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1348] E16. E1 내지 E14 중 어느 하나에 있어서, (SG3932); (SG4010); (SG4057); 및/또는 (SG4052)에 접합되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1349] E17. E1 내지 E14 또는 E16 중 어느 하나에 있어서, (SG3932)에 접합되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1350] E18. E1 내지 E17 중 어느 하나에 있어서, 단클론 항체인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1351] E19. E1 내지 E18 중 어느 하나에 있어서, 인간화 단클론 항체인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1352] E20. E1 내지 E19 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제약 조성물.
- [1353] E21. E1 내지 E19 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.
- [1354] E22. E21의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포.
- [1355] E23. B7-H4에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법으로서, 숙주 세포에서 E22에 따른 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계를 포함하는 방법.
- [1356] E24. E32의 방법에 의해 수득할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [1357] E25. B7-H4를 발현하는 암세포를 포함하는 암을 치료하는 방법으로서, 대상체에게 E1 내지 E19 또는 E24 중 어느 하나의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, E20의 제약 조성물, 또는 이들의 조합을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [1358] E26. 암을 치료하는 데 사용하기 위한 E1 내지 E19 또는 24 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 E20의 제약 조성물로서, 상기 암은 B7-H4를 발현하는 암세포를 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제약 조성물.
- [1359] E27. E25에 따른 방법, 또는 E26에 따라 사용하기 위한 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제약 조성물로서,

상기 암은 유방암, 난소암, 자궁내막암, 담관암종, NSCLC(편평 및/또는 선암종), 췌장암 및 위암으로부터 선택되는 것인, 방법 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제약 조성물.

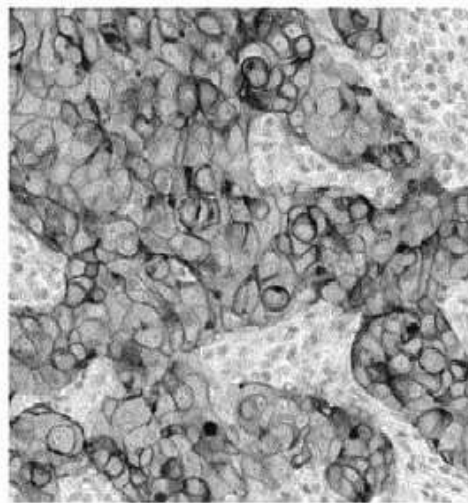
- [1360] E28. E25 내지 E27 중 어느 하나에 따른, 방법, 또는 사용하기 위한 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제약 조성물로서, 상기 암은 유방암, 난소암, 자궁내막암 및 담관암종으로부터 선택되는 것인, 방법 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제약 조성물.
- [1361] E29. E25 내지 E28 중 어느 하나에 따른, 방법, 또는 사용하기 위한 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제약 조성물로서, 상기 암은 호르몬 수용체-양성(HR+) 유방암, 인간 표피 성장 인자 수용체 2 양성(HER2+) 유방암 및 삼중 음성 유방암(TNBC)으로부터 선택되는 유방암인 것인, 방법 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제약 조성물.
- [1362] E30. 샘플에서 B7-H4 폴리펩티드의 존재 또는 부재를 검출하는 방법으로서,
- [1363] i. 샘플을 E1 내지 E19 또는 E24 중 어느 하나에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 E20에 따른 제약 조성물을 접촉시켜 항체-항원 복합체를 제공하는 단계;
- [1364] ii. 상기 항체-항원 복합체의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하고;
- [1365] iii. 여기서 항체-항원 복합체의 존재는 B7-H4 폴리펩티드의 존재를 확인시켜 주고;
- [1366] iv. 항체-항원 복합체의 부재는 B7-H4 폴리펩티드의 부재를 확인시켜 주는 것인 방법.
- [1367] E31. E30에 있어서, 상기 항체-항원 복합체의 존재는 암 세포의 존재를 나타내고, 상기 항체-항원 복합체의 부재는 암 세포의 부재를 나타내는 것인 방법.
- [1368] E32. E30 또는 E31에 있어서, 샘플은 대상체로부터 획득할 수 있는 분리된 샘플인 것인 방법.
- [1369] E33. E30 내지 E32 중 어느 하나에 있어서, B7-H4 폴리펩티드는 암세포의 필수 구성요소인 것인 방법.
- [1370] E34. 항체-약물 접합체(ADC)로서,
- [1371] (i) 다음을 포함하는 인간 B7-H4에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편: 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1; 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3; 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1; 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2; 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3;
- [1372] (ii) 링커; 및
- [1373] (iii) 세포독성제를 포함하고, 여기서 세포독성제는 SG3932이고,
- [1374] ADC는 8의 약물 대 항체 비율(DAR)을 갖는 것인 항체-약물 접합체.
- [1375] E35. E34에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄(VH) 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄(VL)를 포함하는 것인 ADC.
- [1376] E36. E34 또는 E35에 있어서, 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(HC) 및 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(LC)를 포함하는 ADC.
- [1377] E37. E34 내지 E37 중 어느 하나의 ADC를 포함하는 제약 조성물.
- [1378] E38. B7-H4를 발현하는 암세포를 포함하는 암을 치료하는 방법으로서, 대상체에게 E34 내지 E37 중 어느 하나의 ADC, 또는 E37의 제약 조성물, 또는 이들의 조합을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

도면

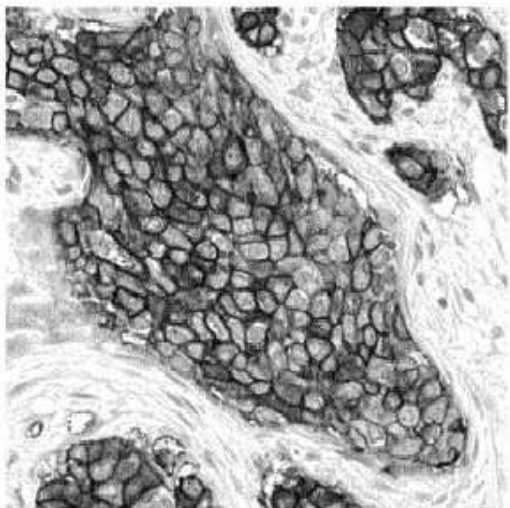
도면1



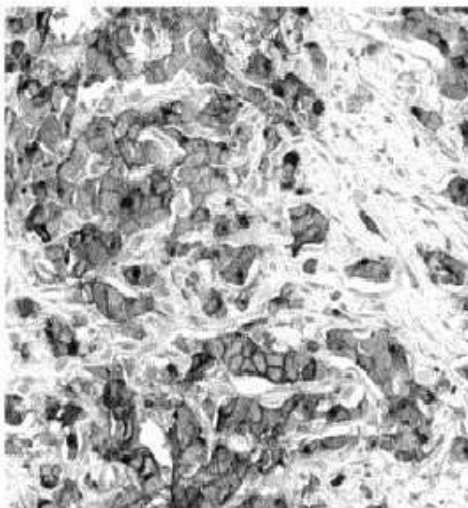
A



B

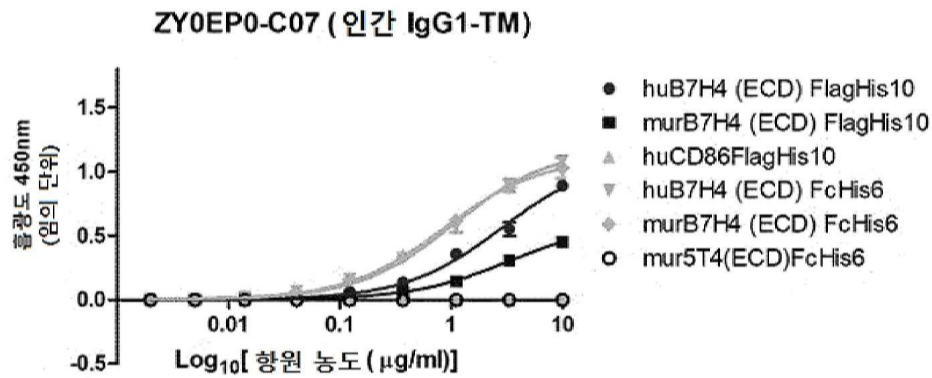


C

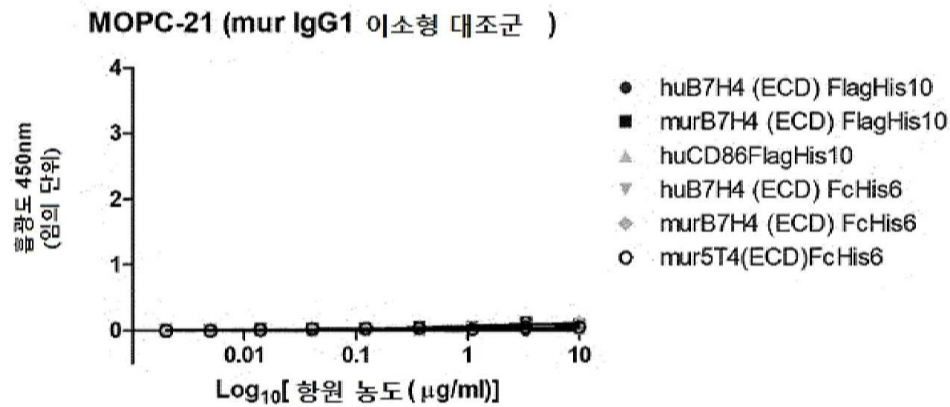


D

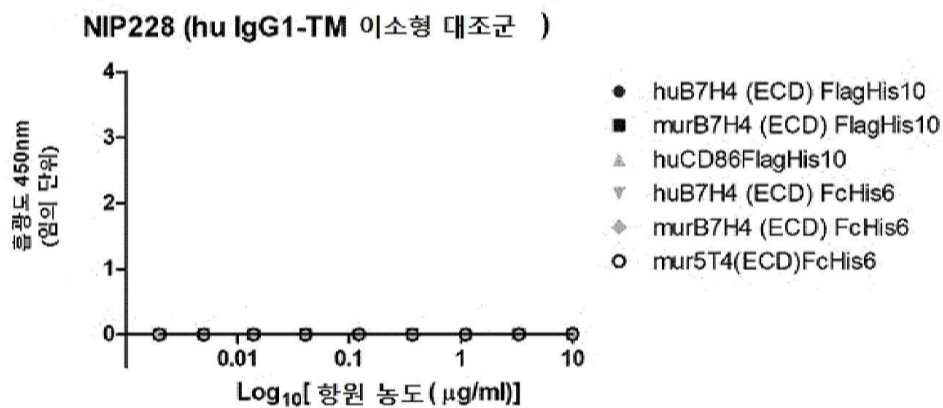
도면2a



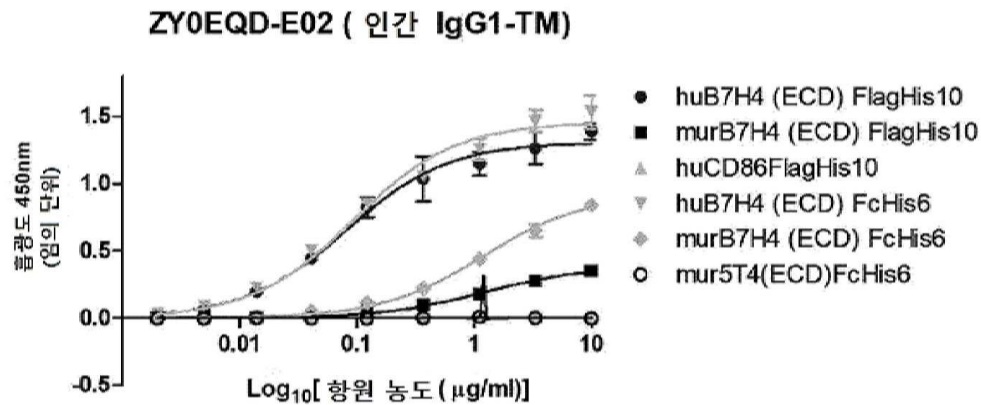
도면2b



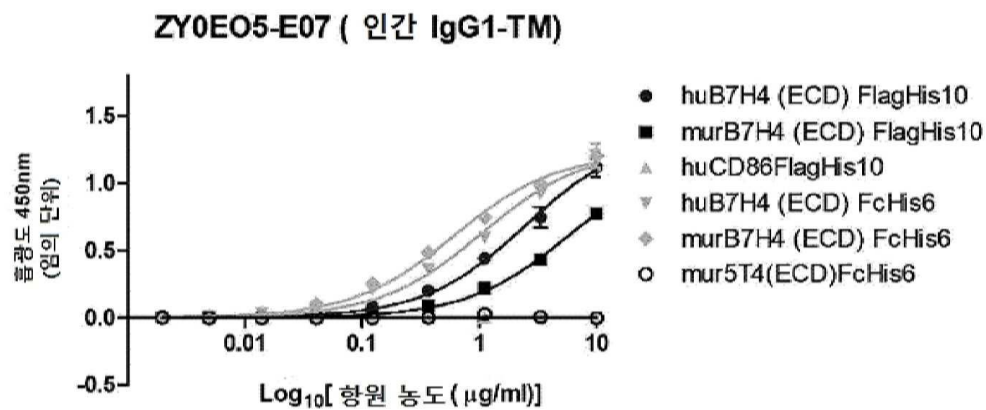
도면2c



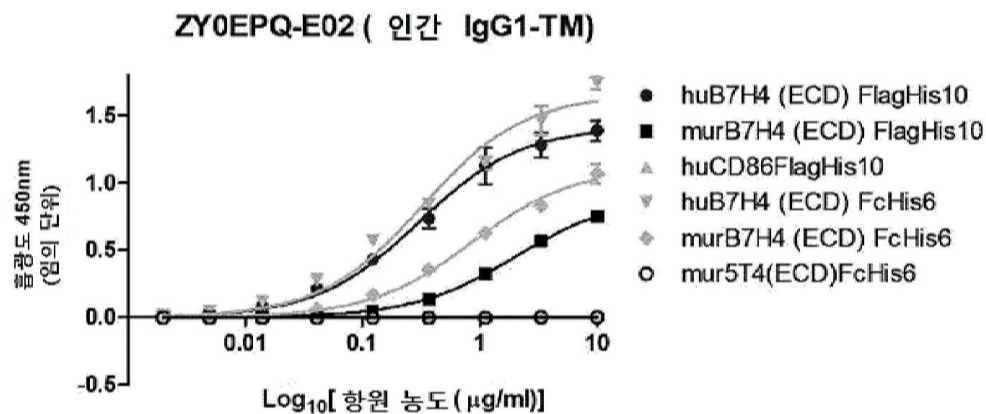
도면2d



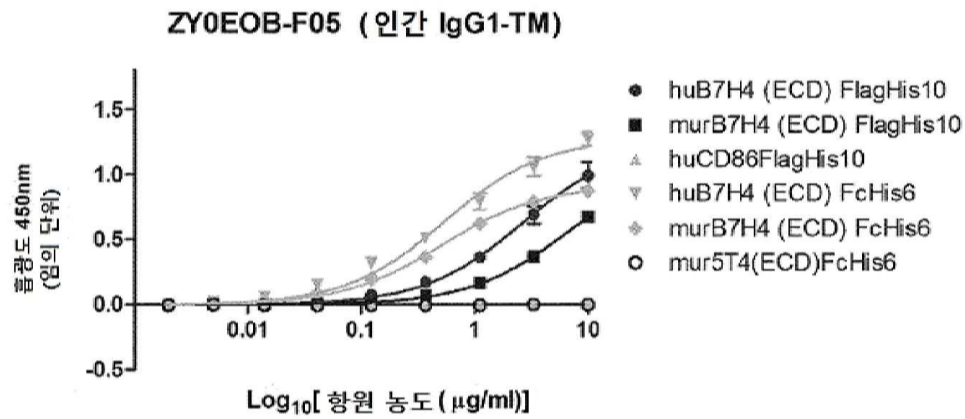
도면2e



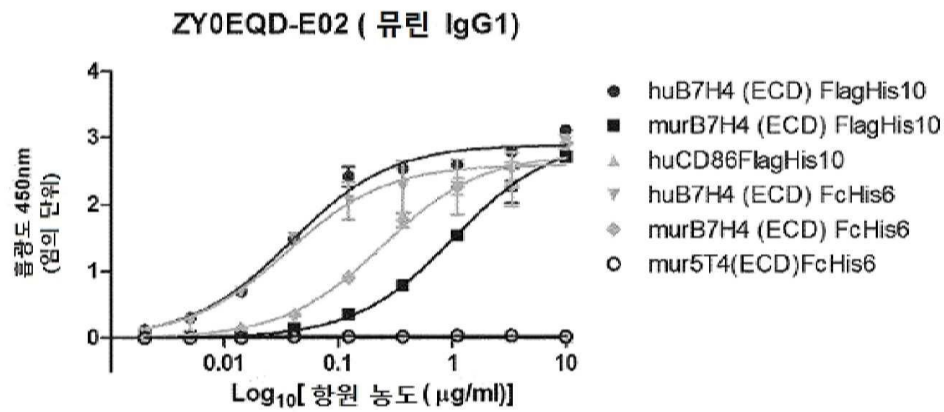
도면2f



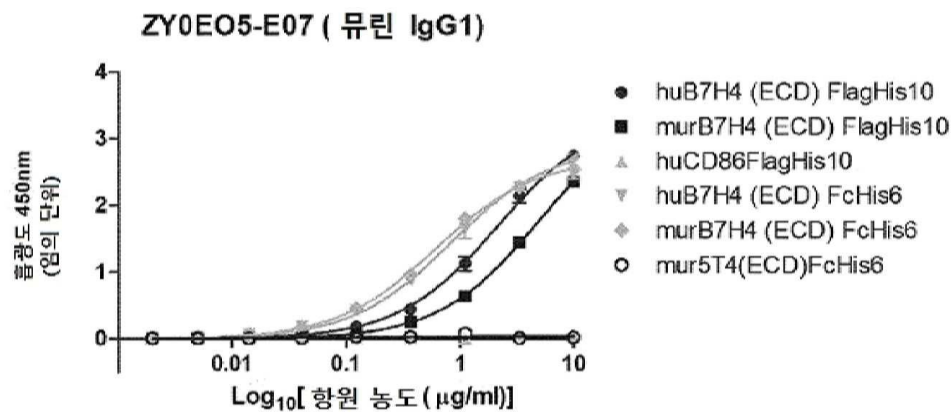
도면2g



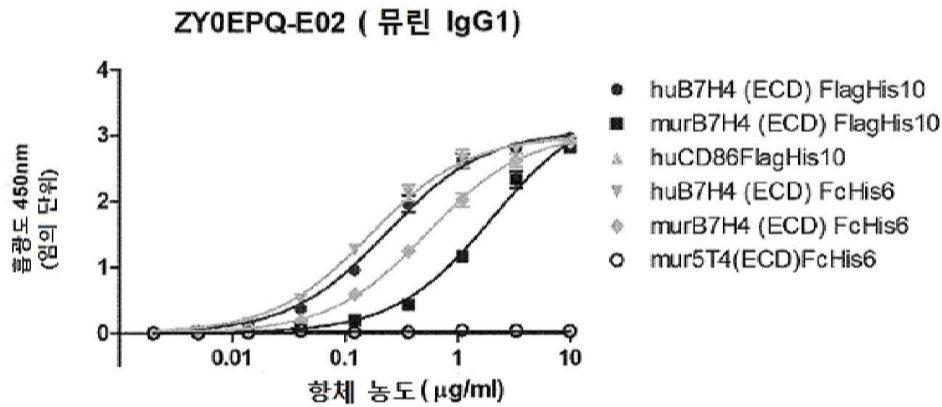
도면2h



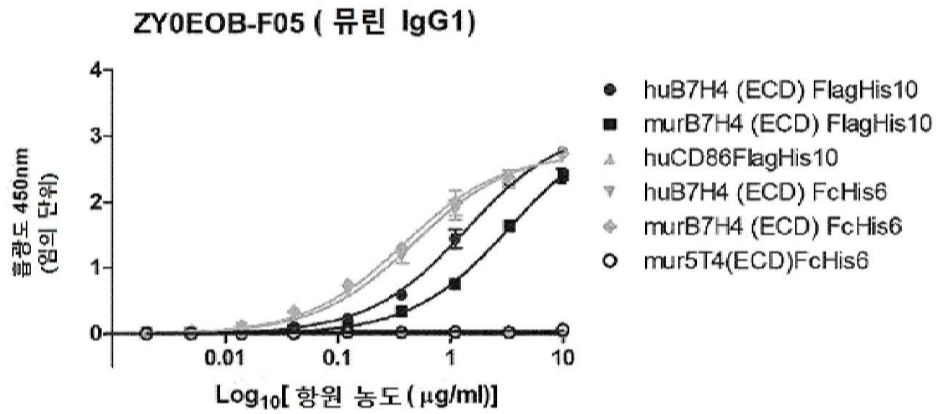
도면2i



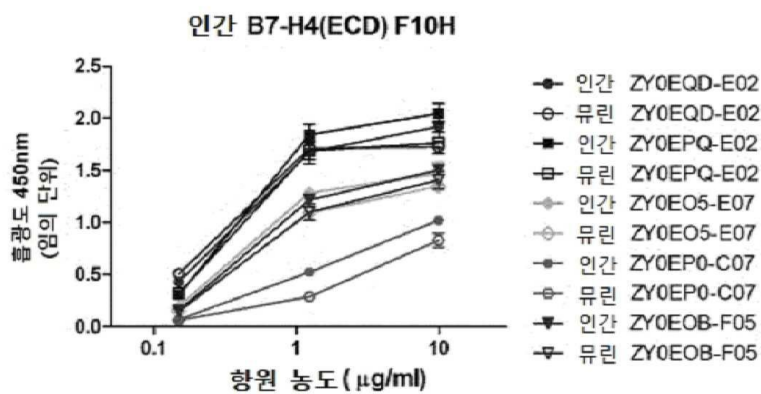
도면2j



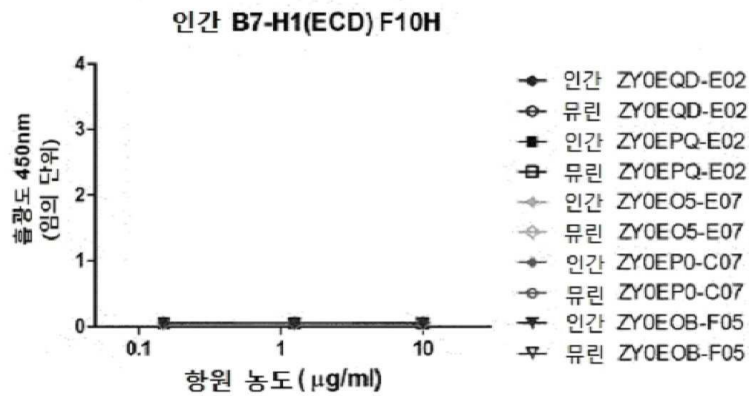
도면2k



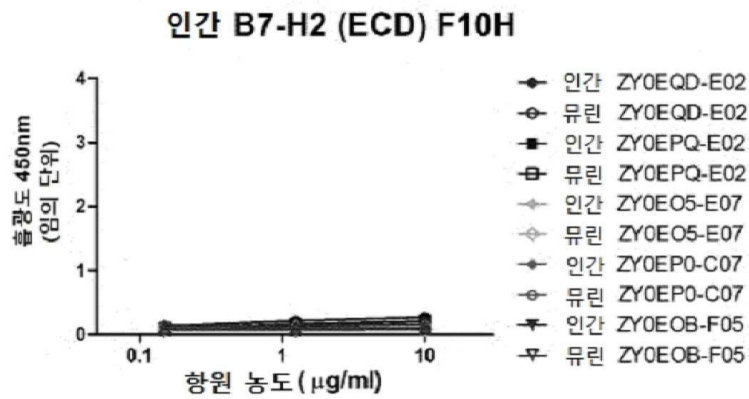
도면3a



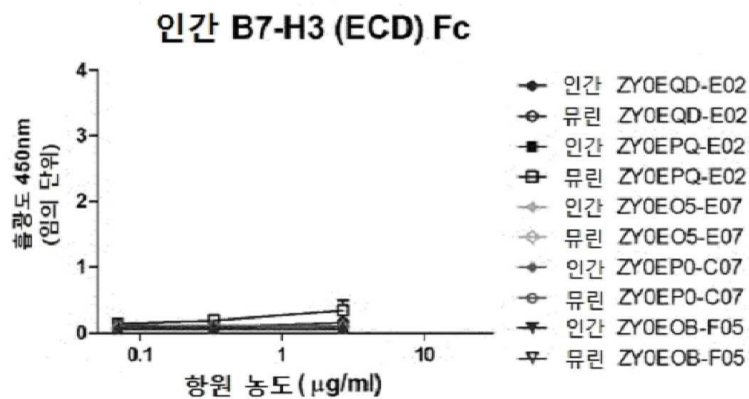
도면3b



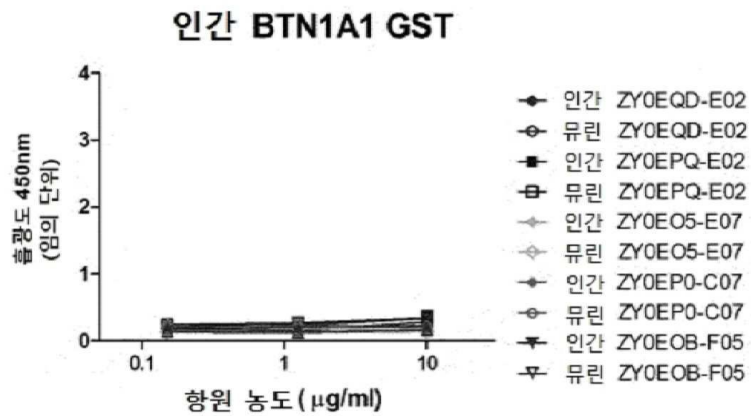
도면3c



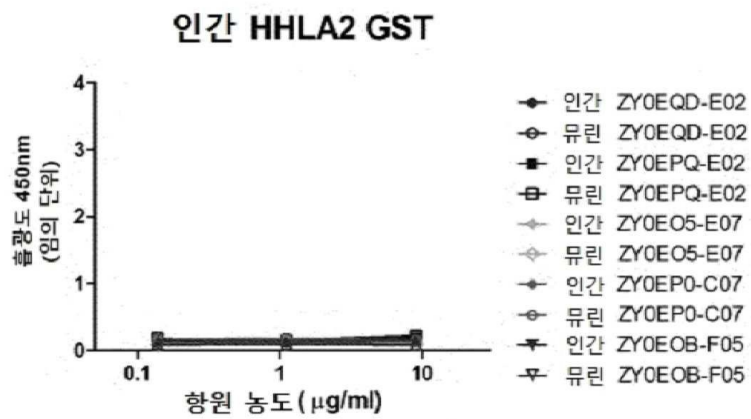
도면3d



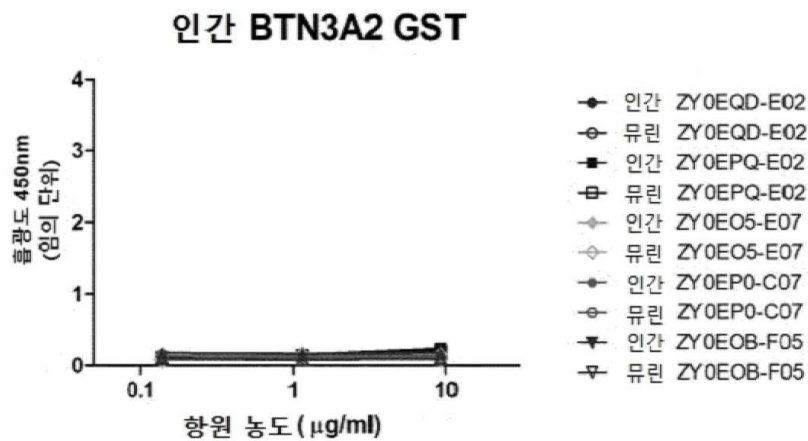
도면3e



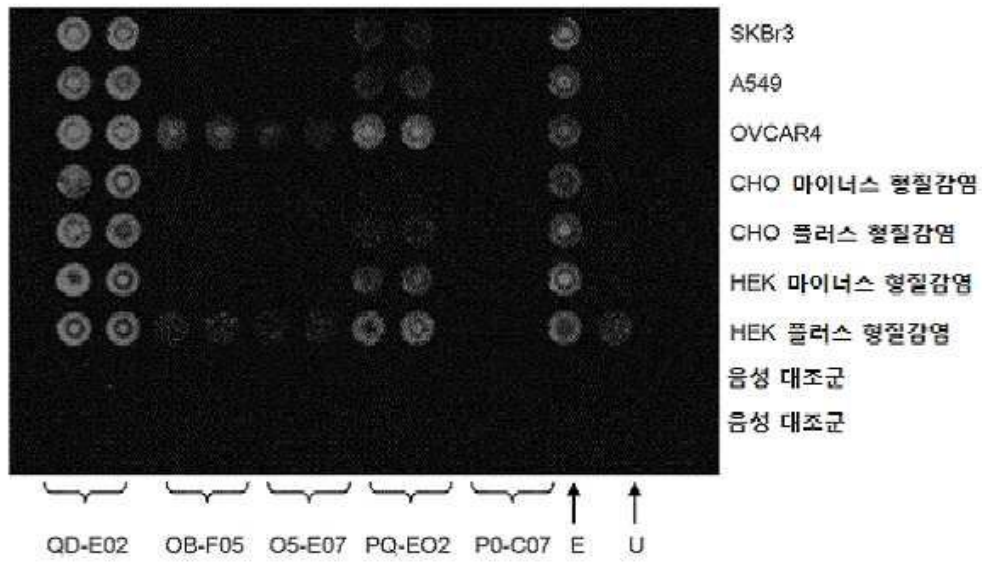
도면3f



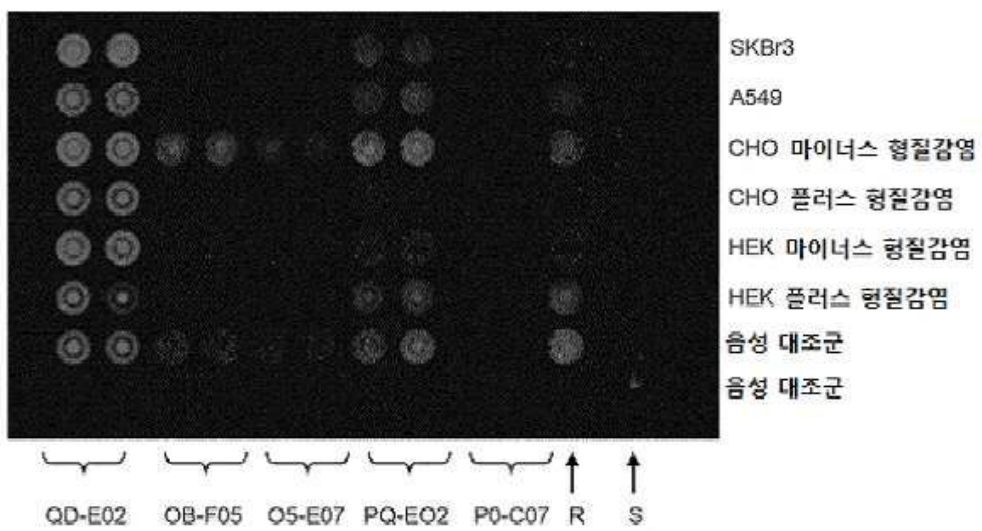
도면3g



도면4

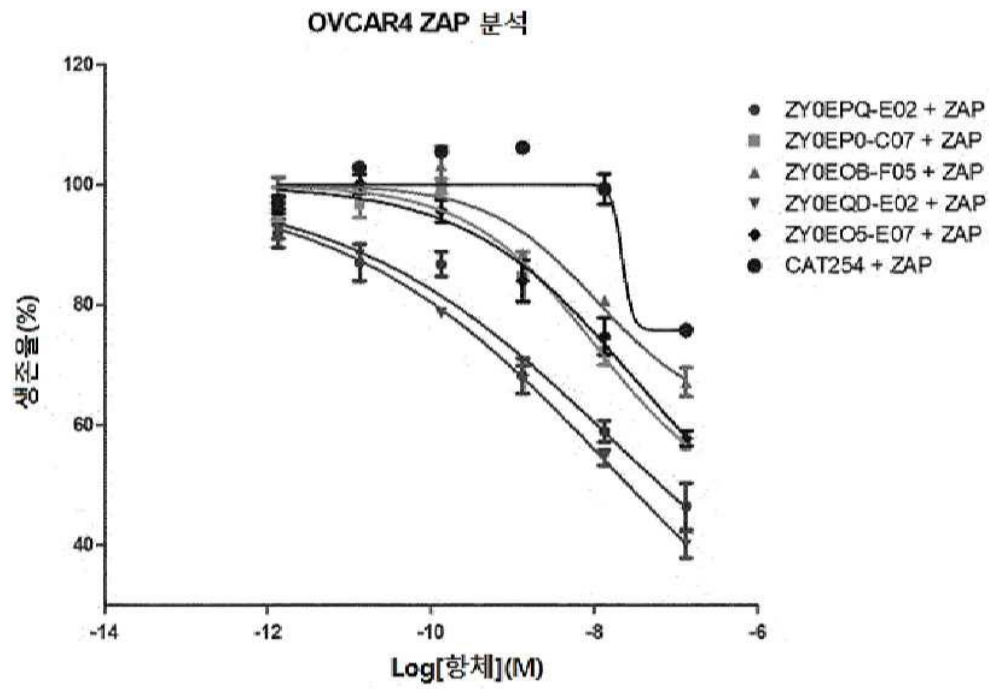


A

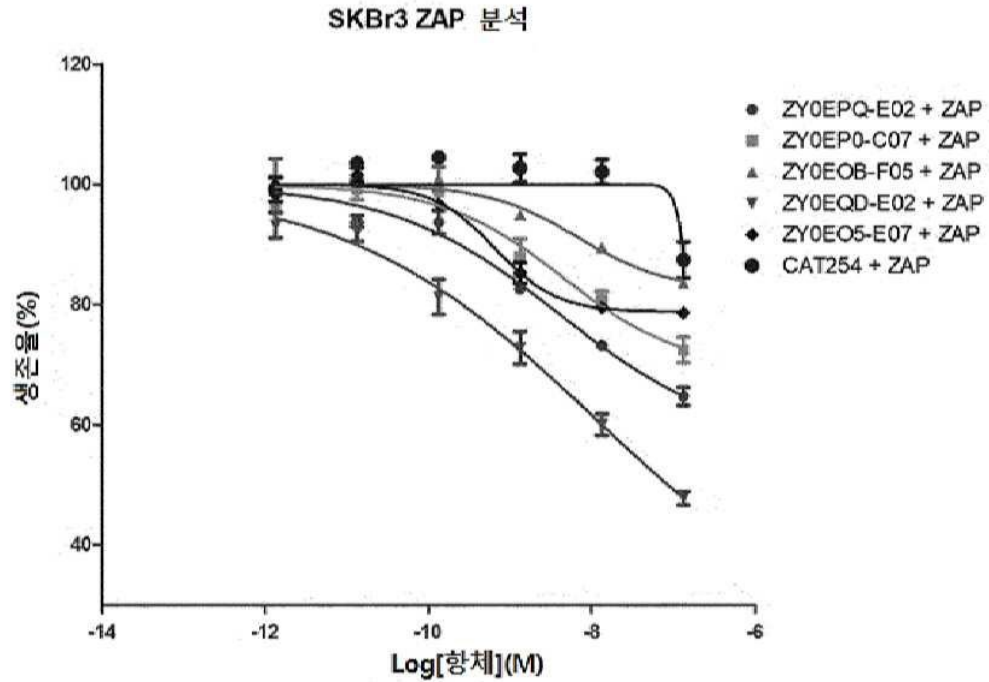


B

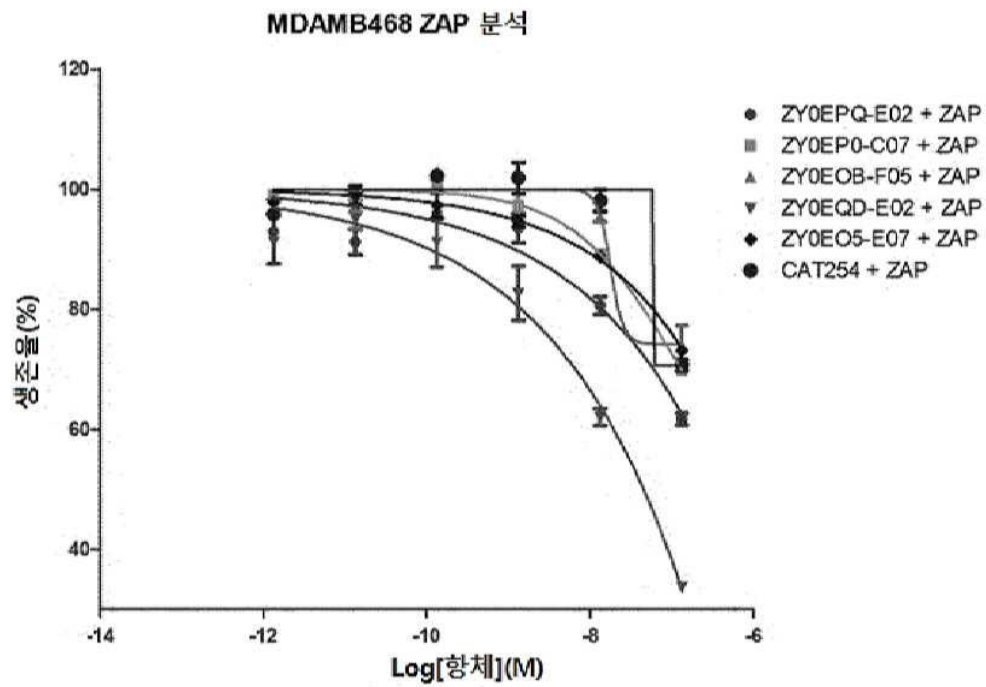
도면5a



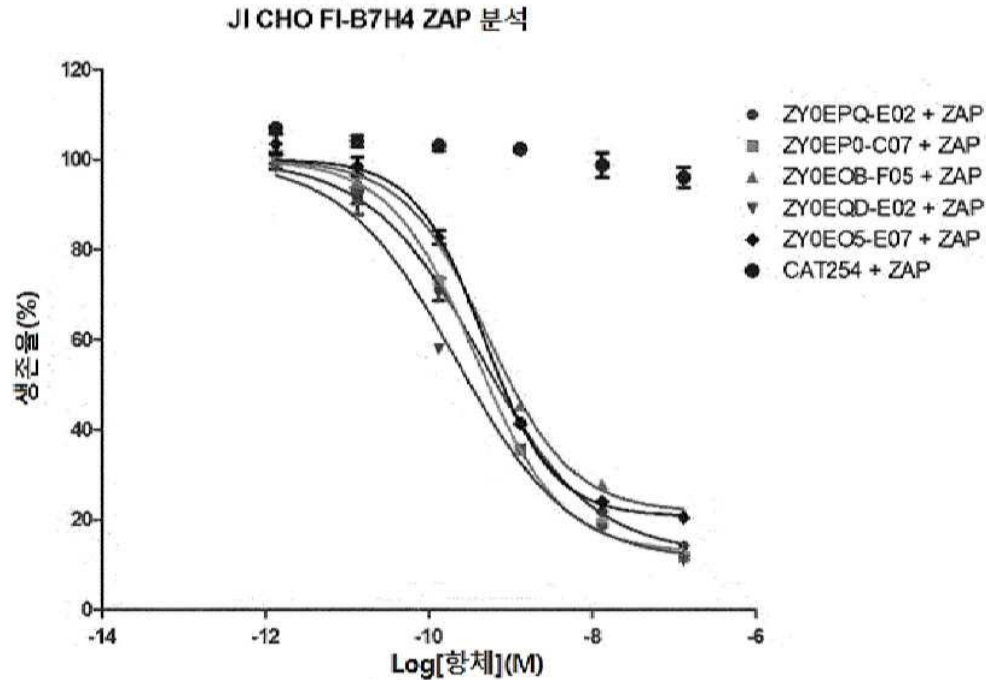
도면5b



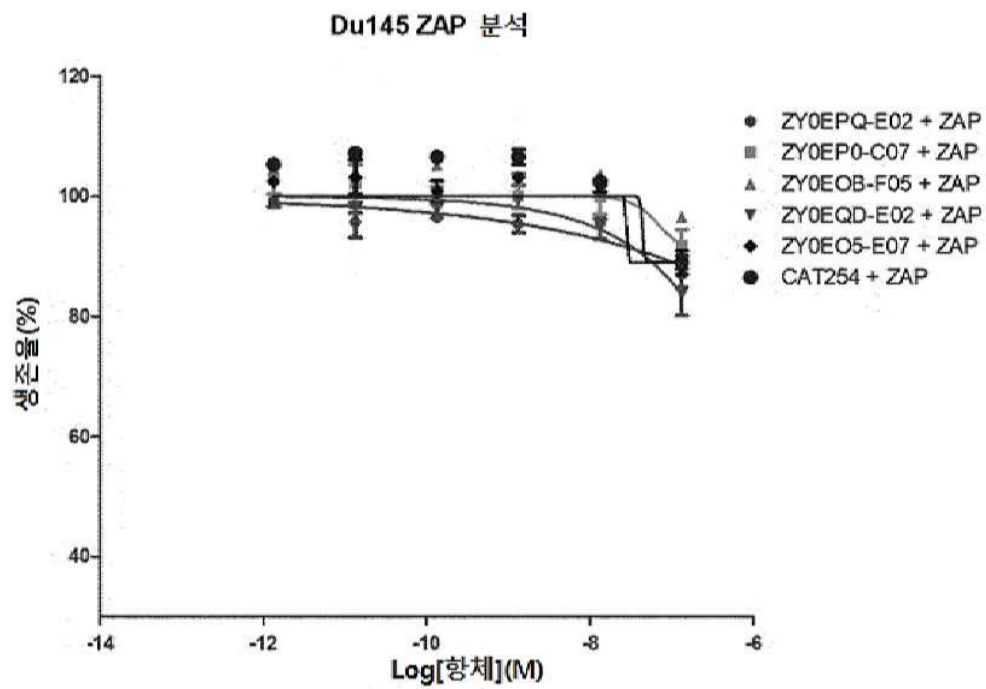
도면5c



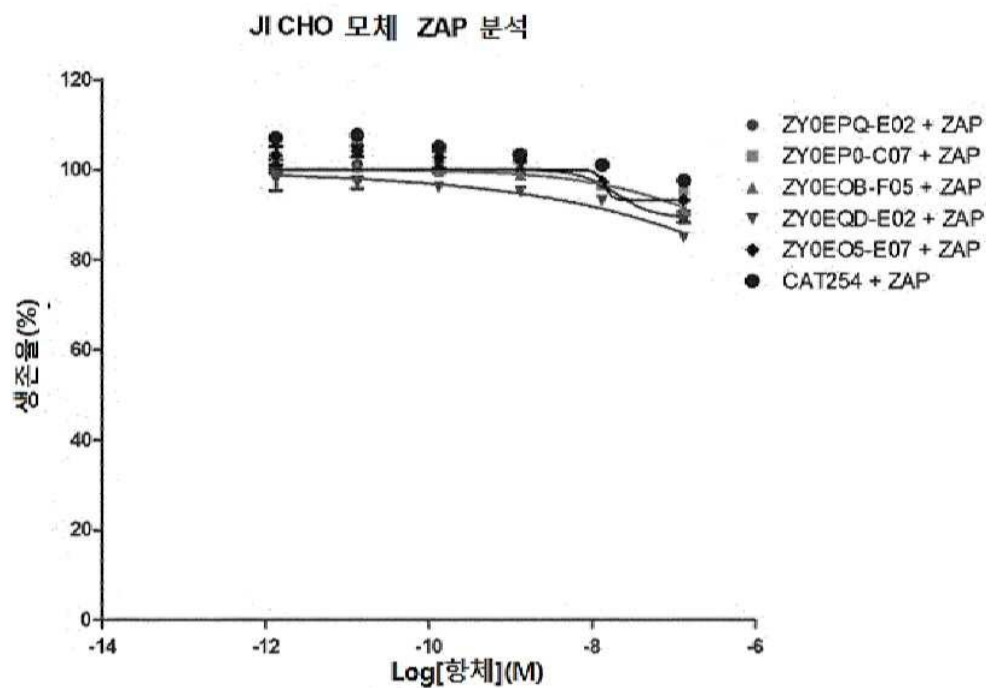
도면5d



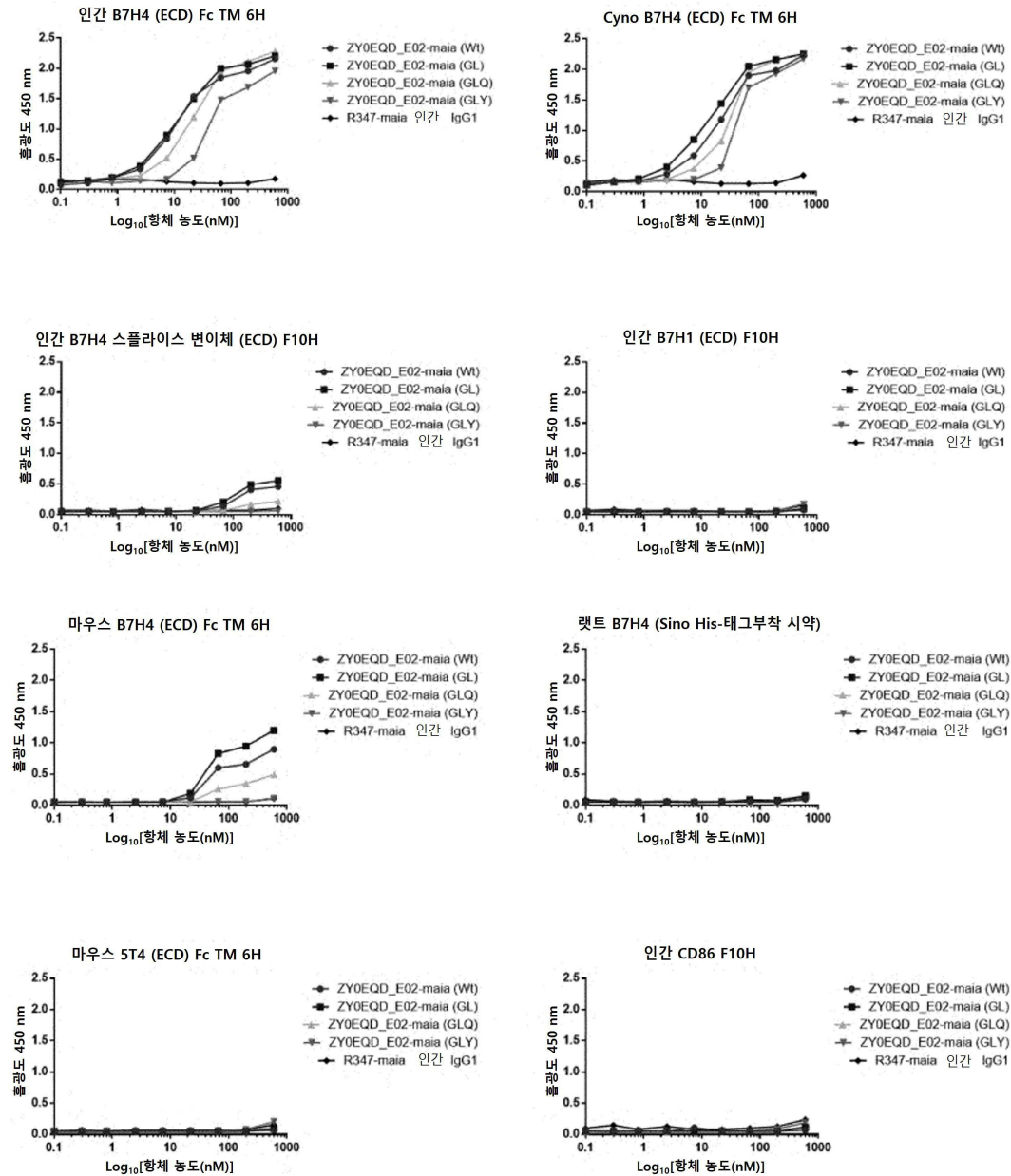
도면5e



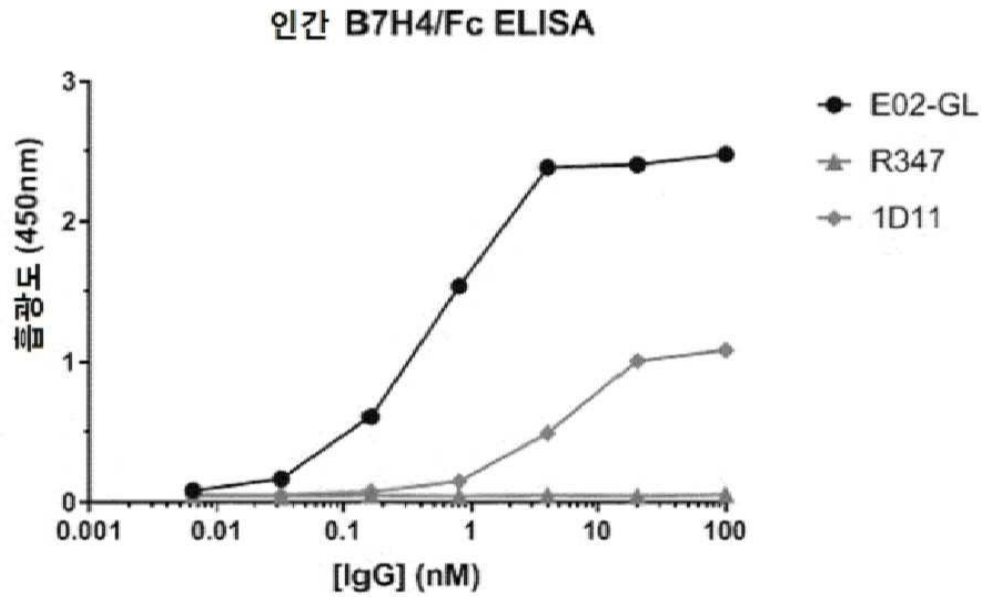
도면5f



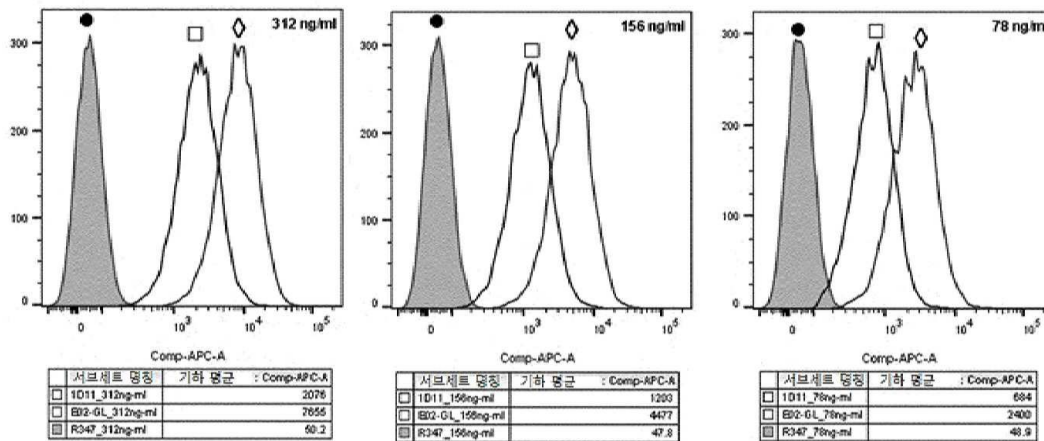
도면6



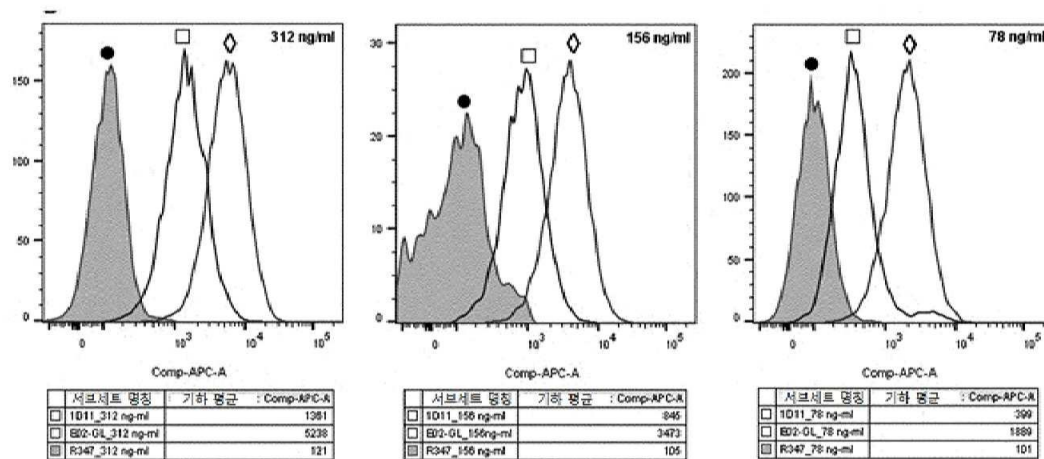
도면7



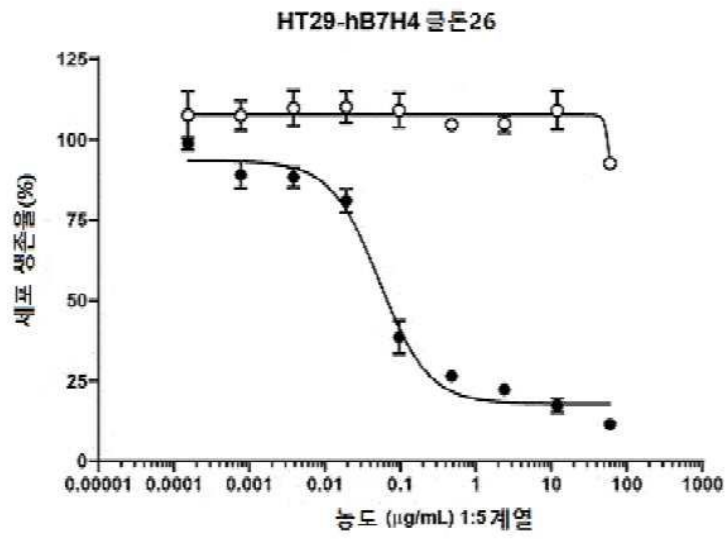
도면8a



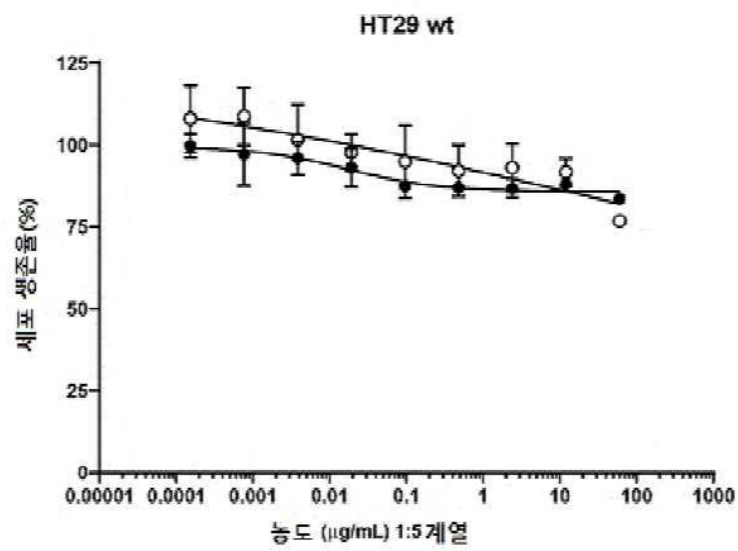
도면8b



도면9

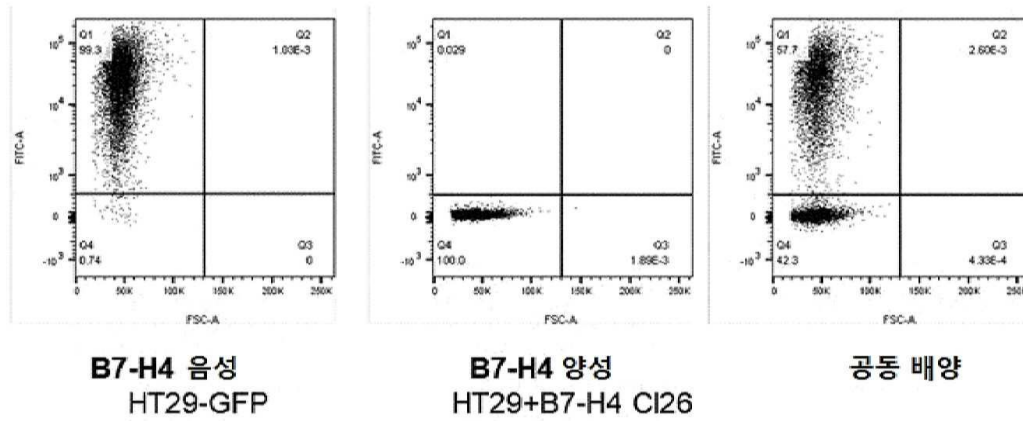


A

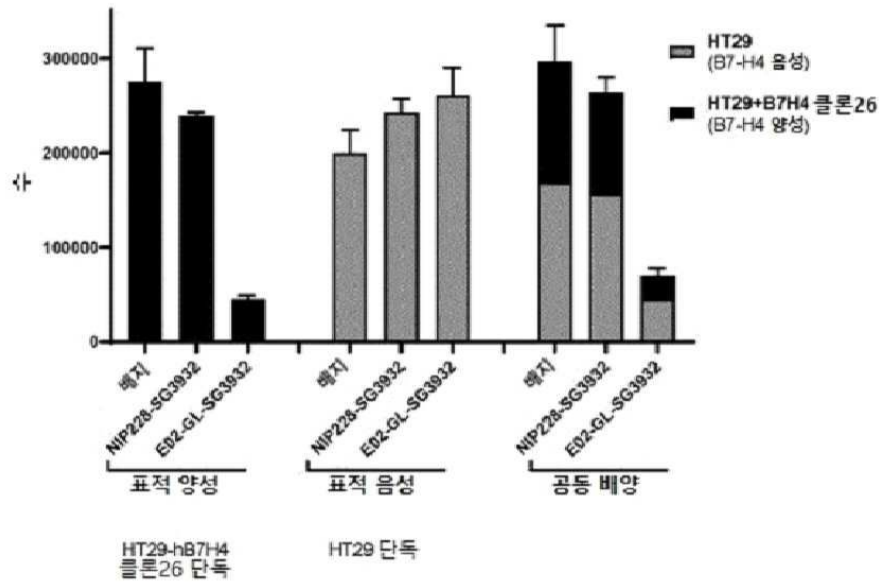


B

도면10a

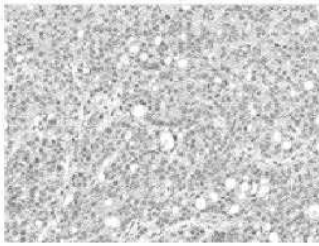


도면10b

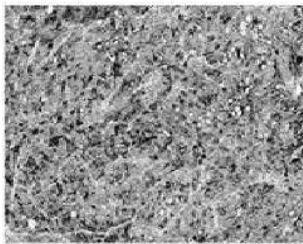


도면11

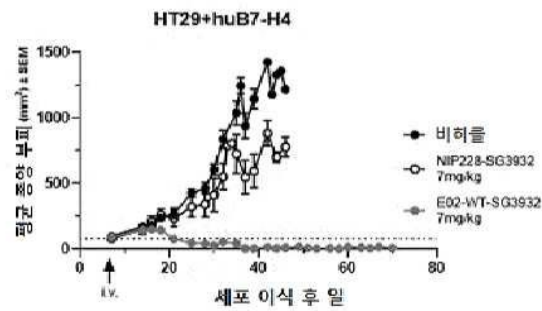
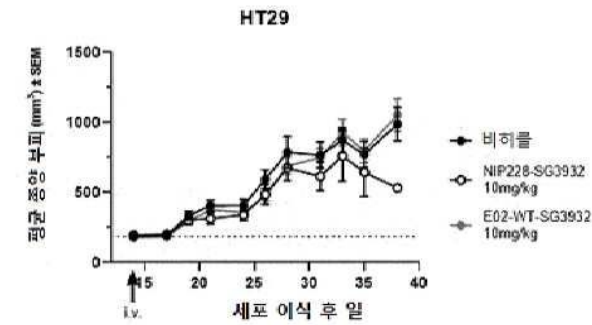
B7-H4 IHC:



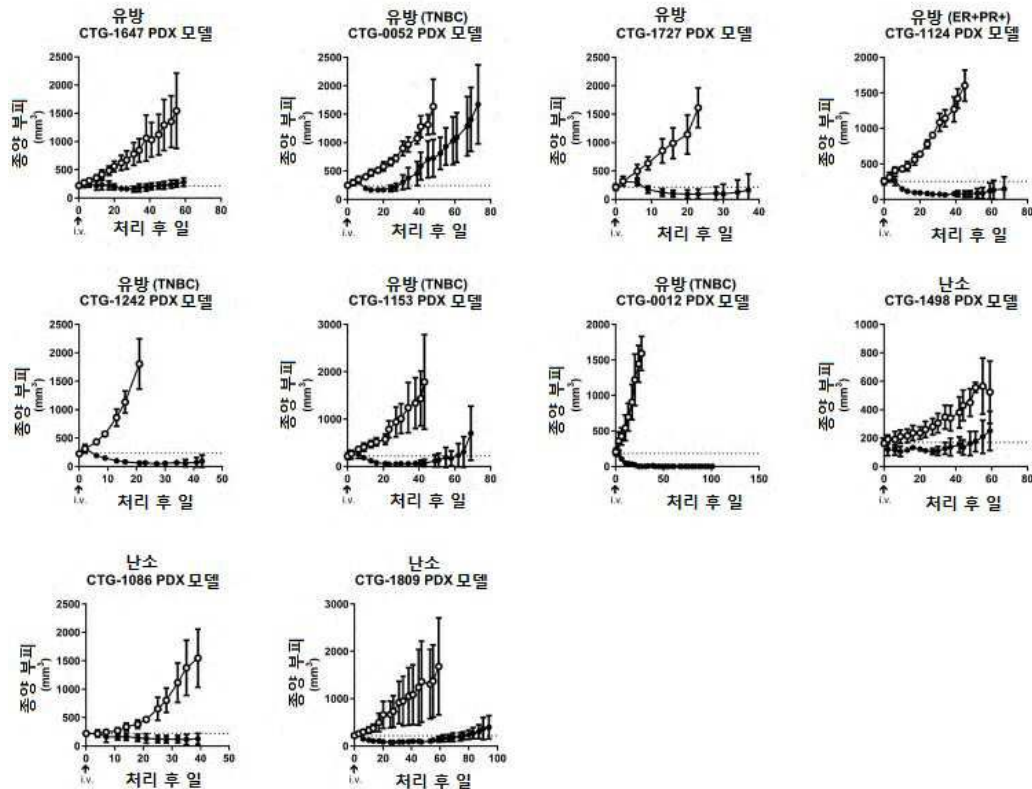
HT29:
B7-H4 음성 모델



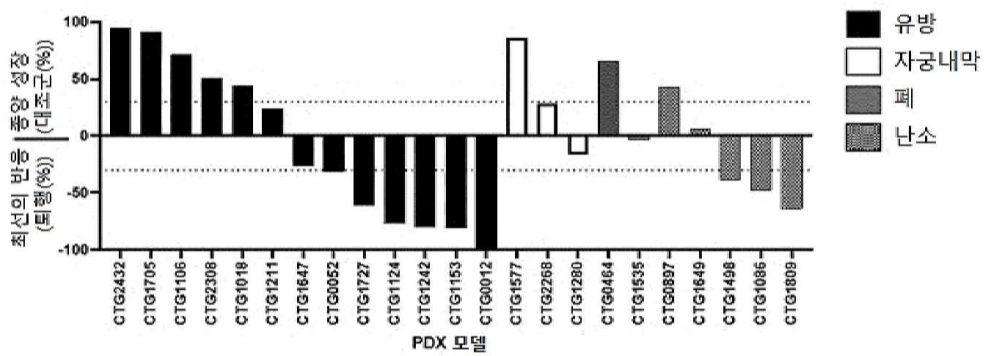
HT29+huB7H4 클론4:
이중 모델
40% B7-H4 3+, 60% B7-H4 음성



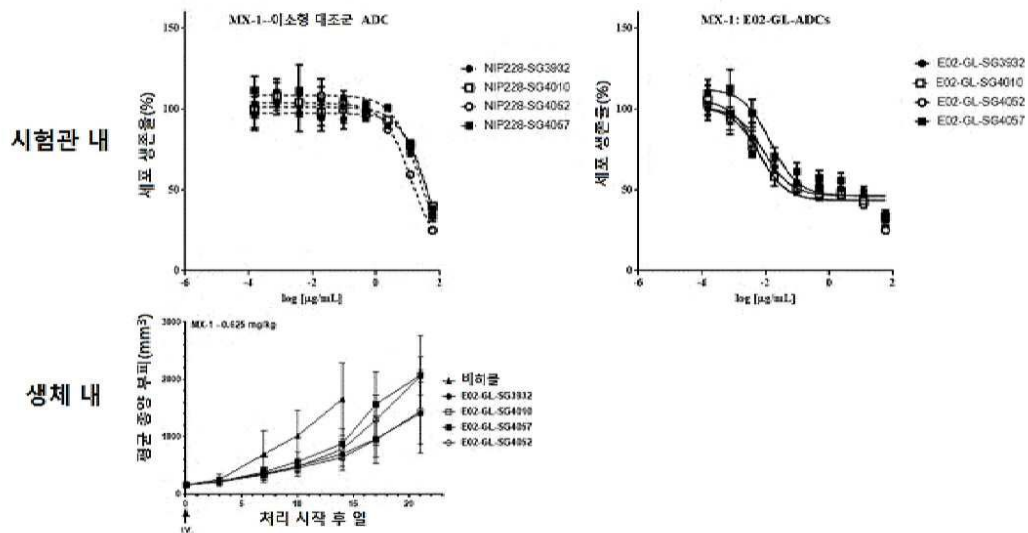
도면12



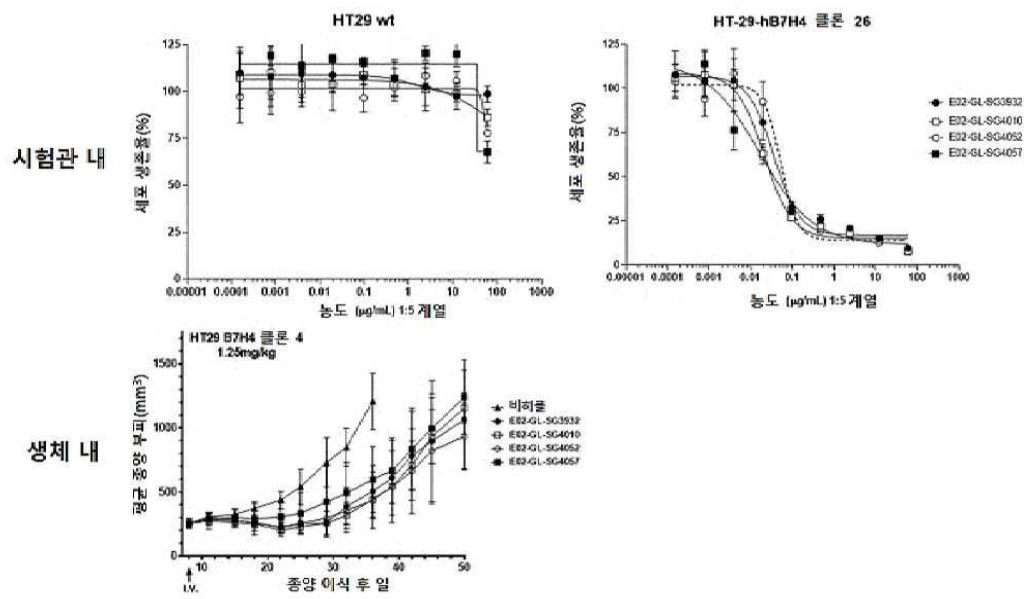
도면13



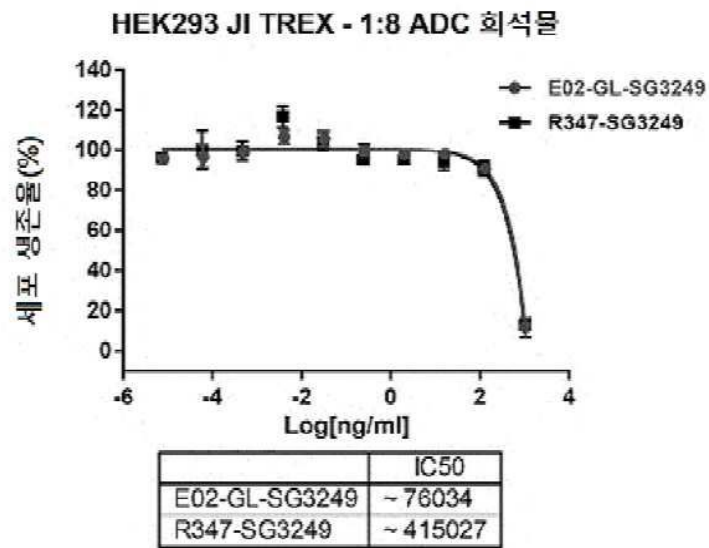
도면14a



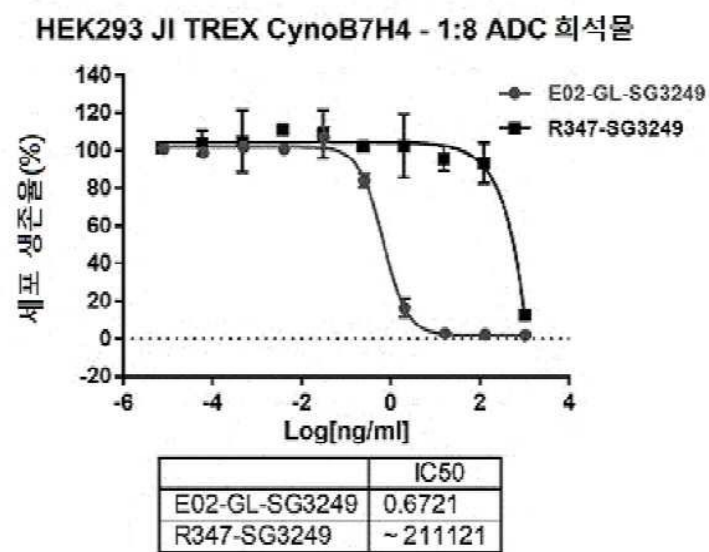
도면14b



도면15

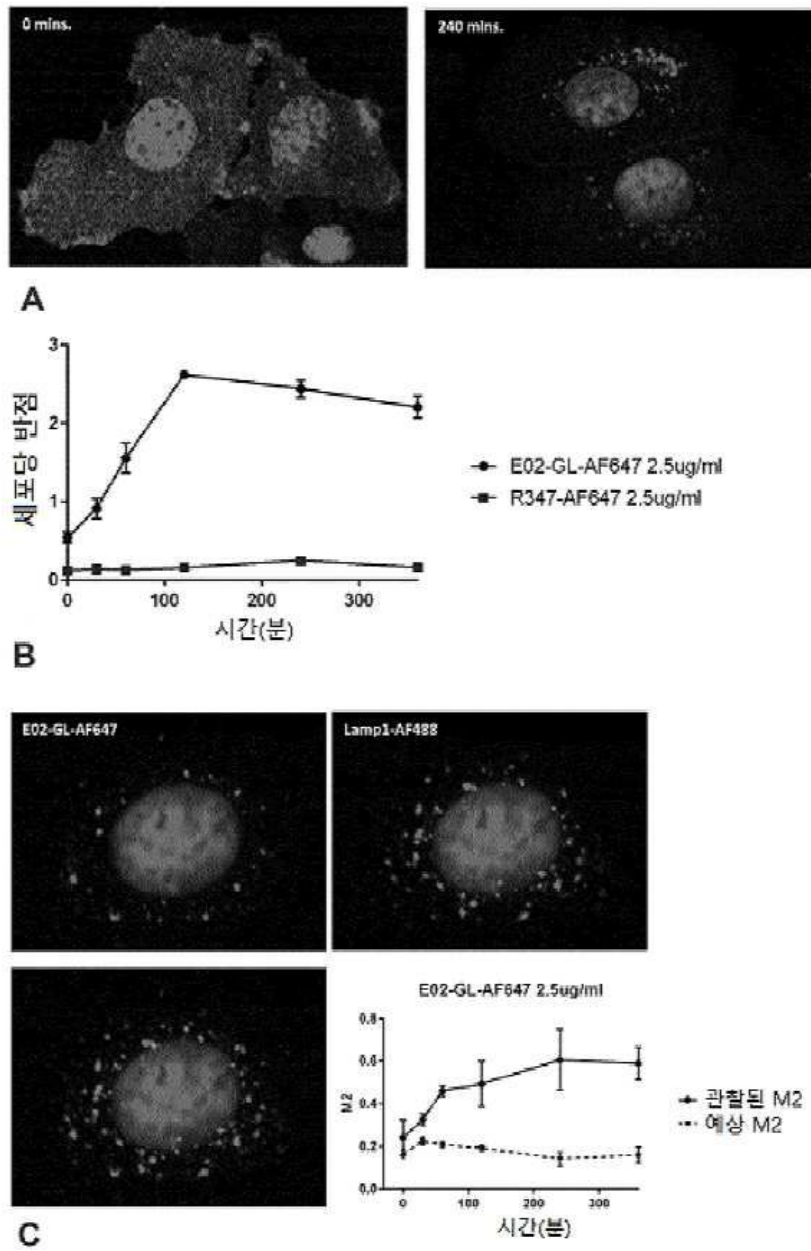


A

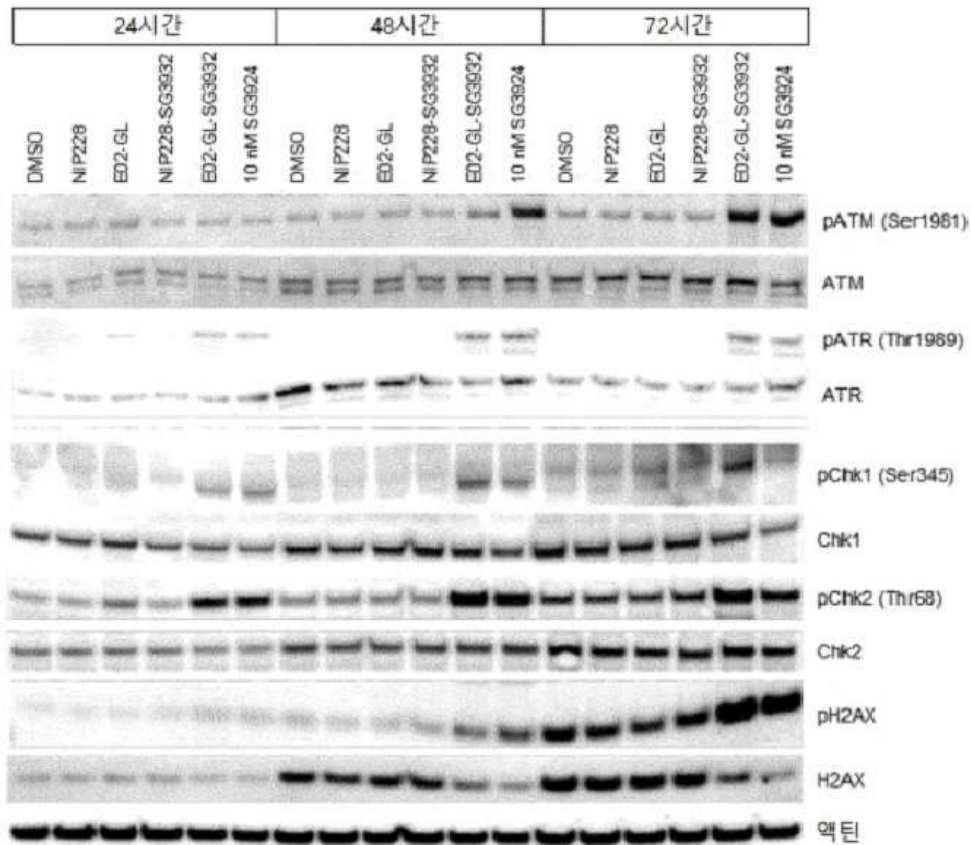


B

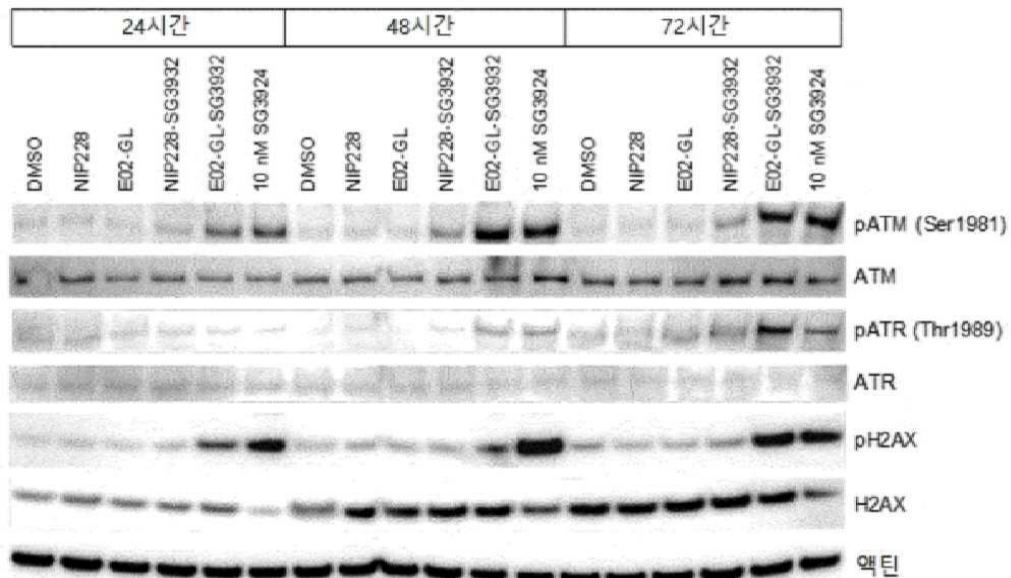
도면16



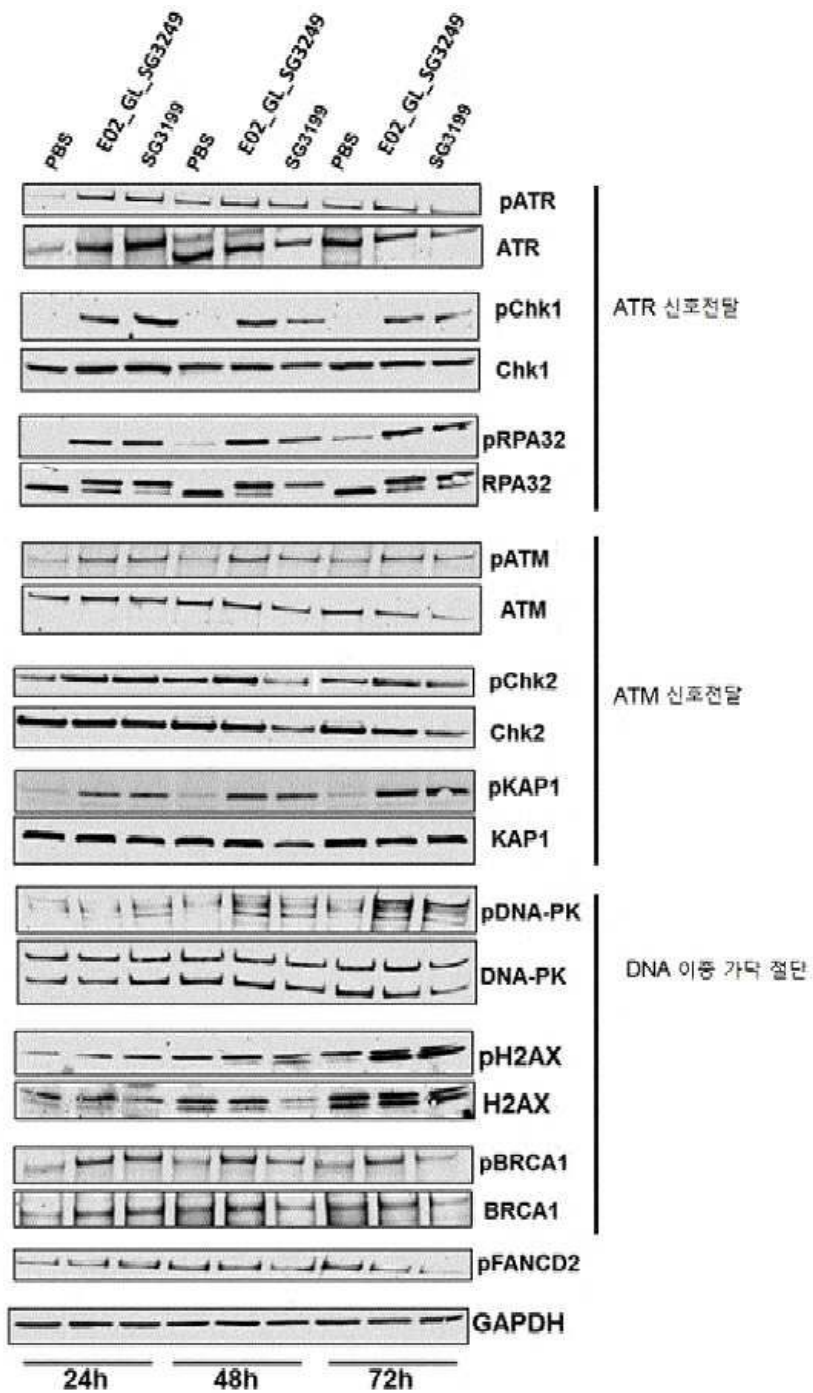
도면17a



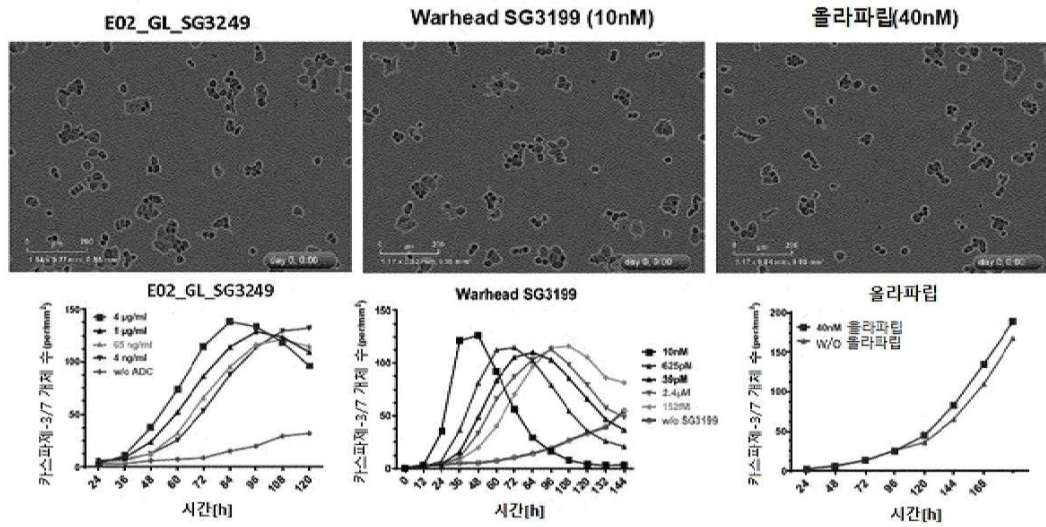
도면17b



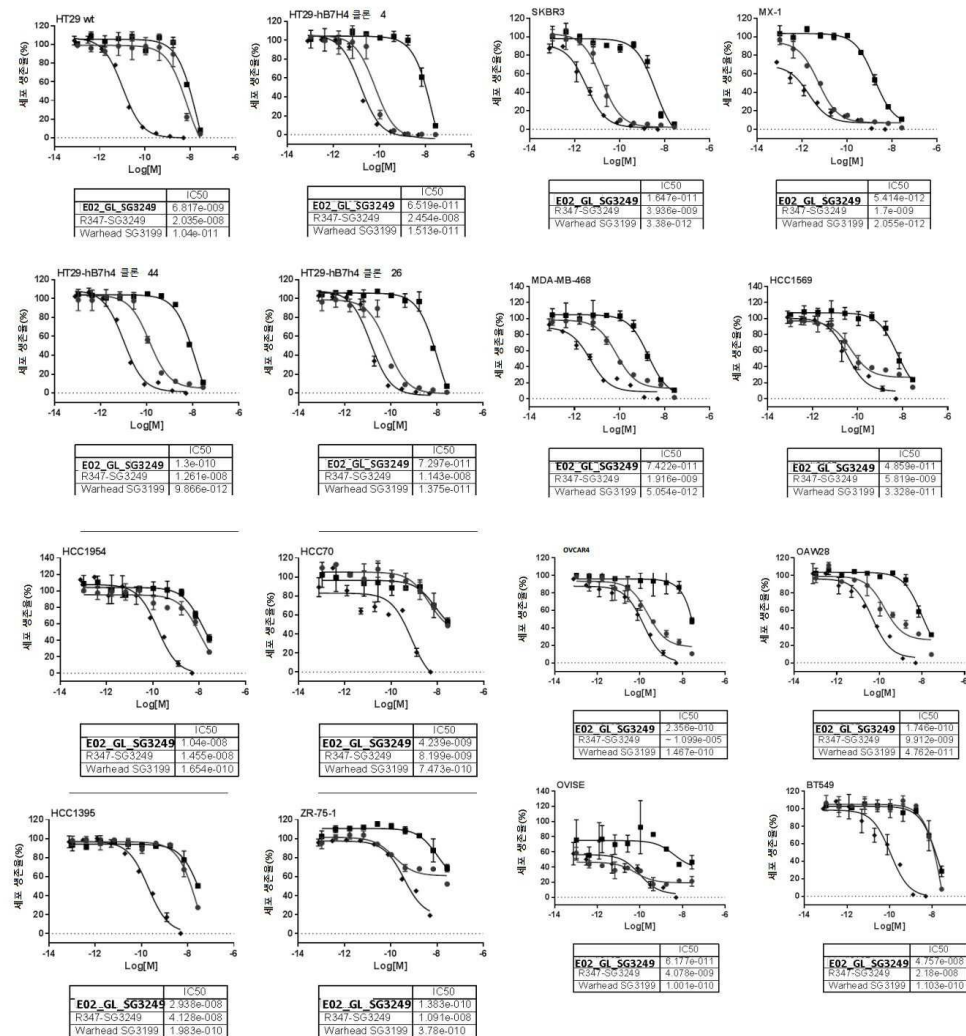
도면17c



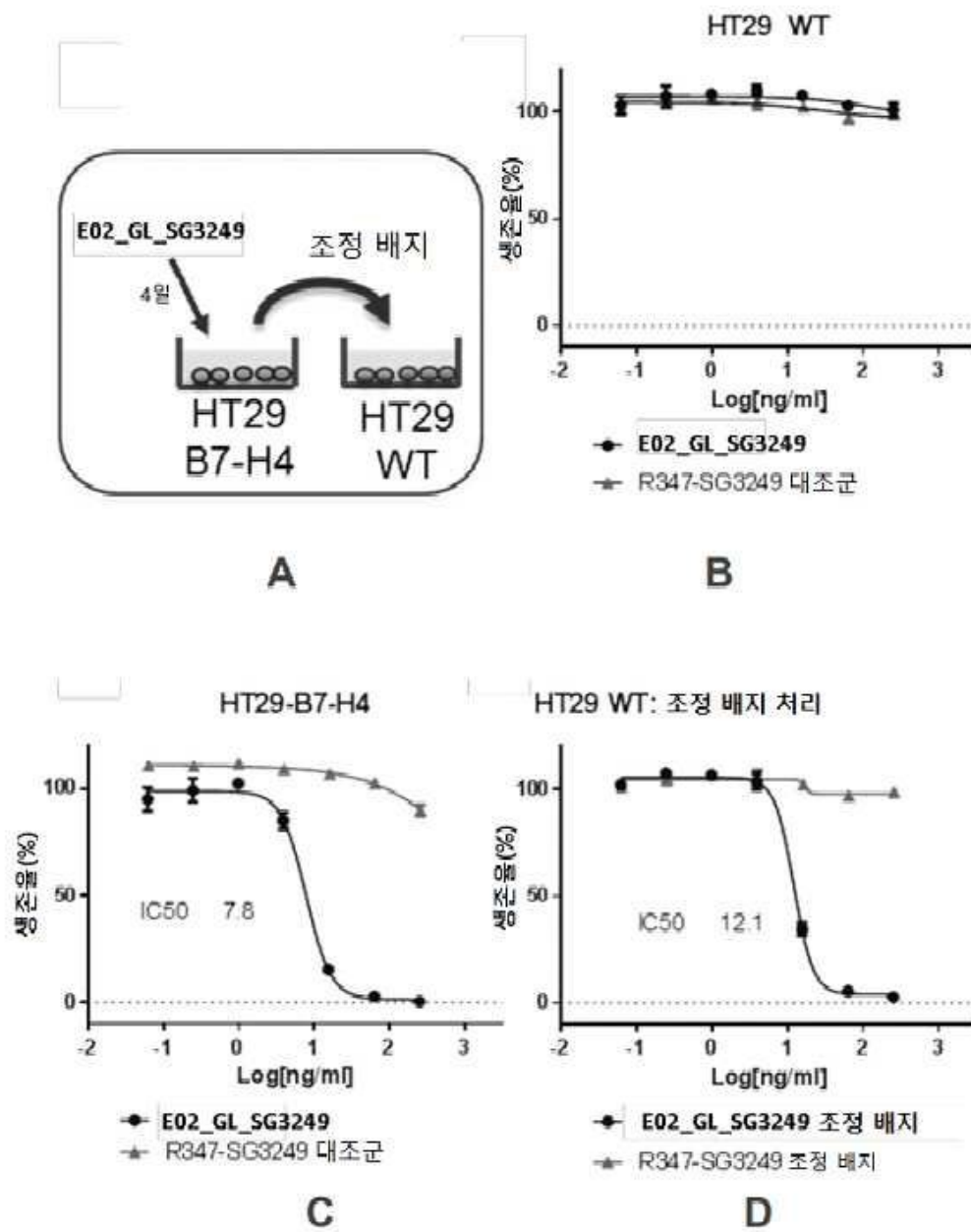
도면18



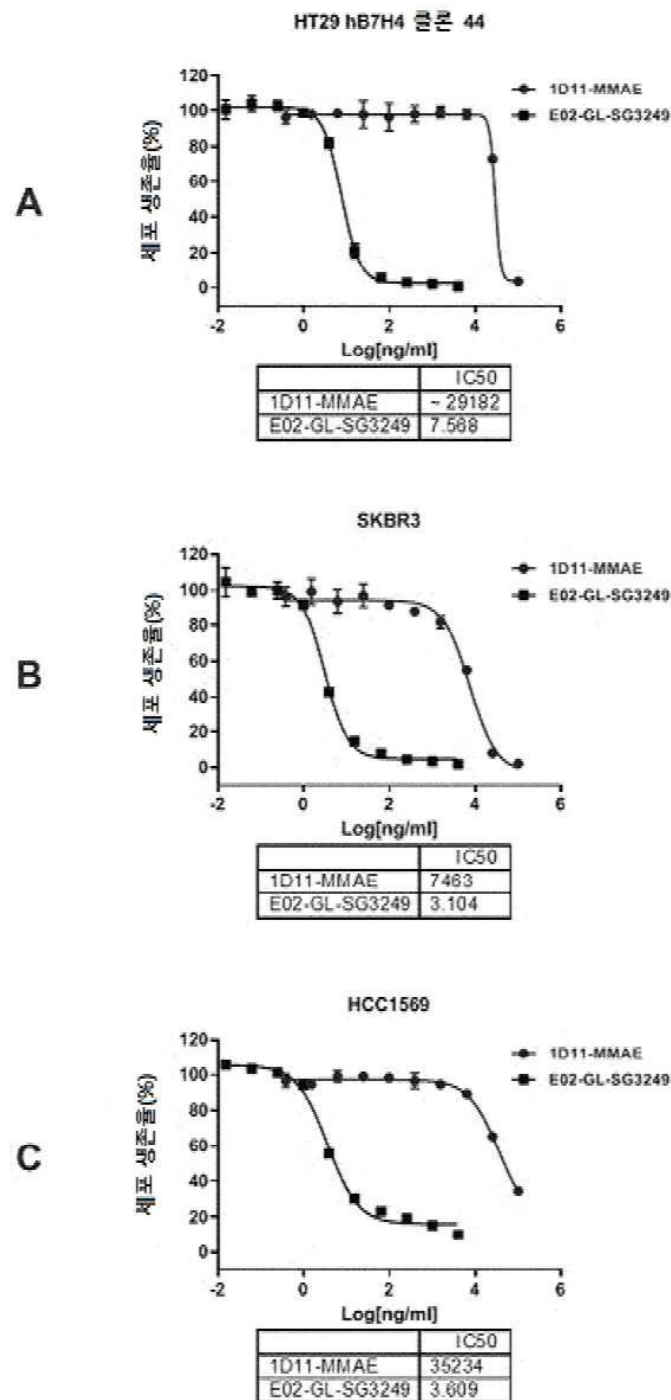
도면19



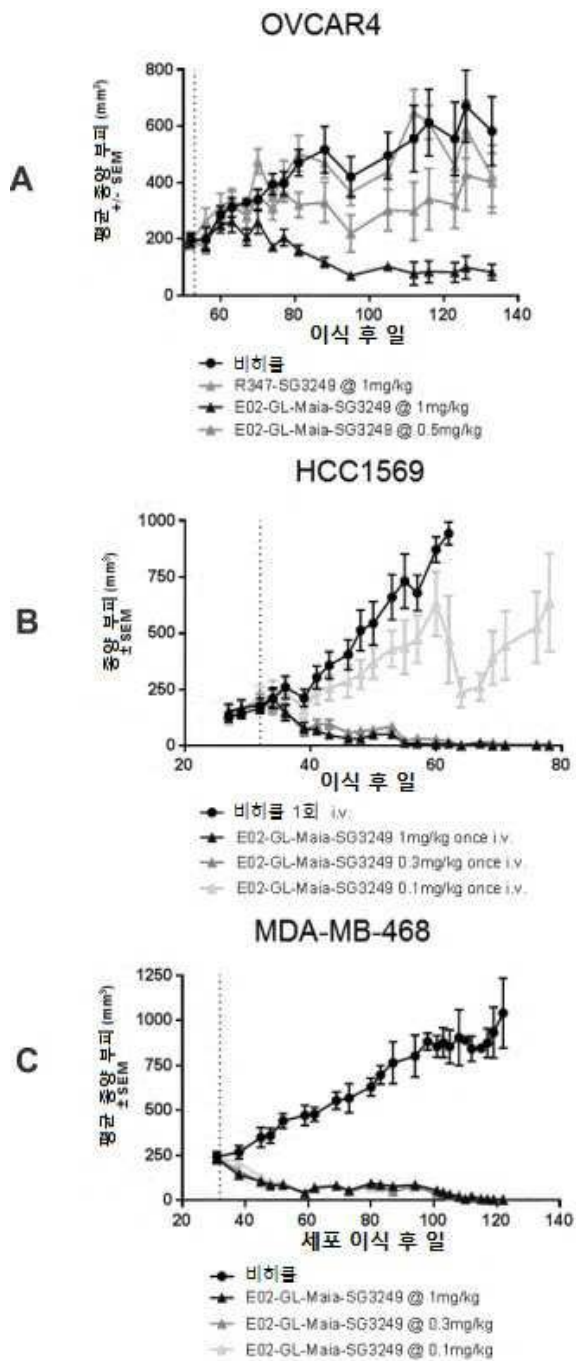
도면20



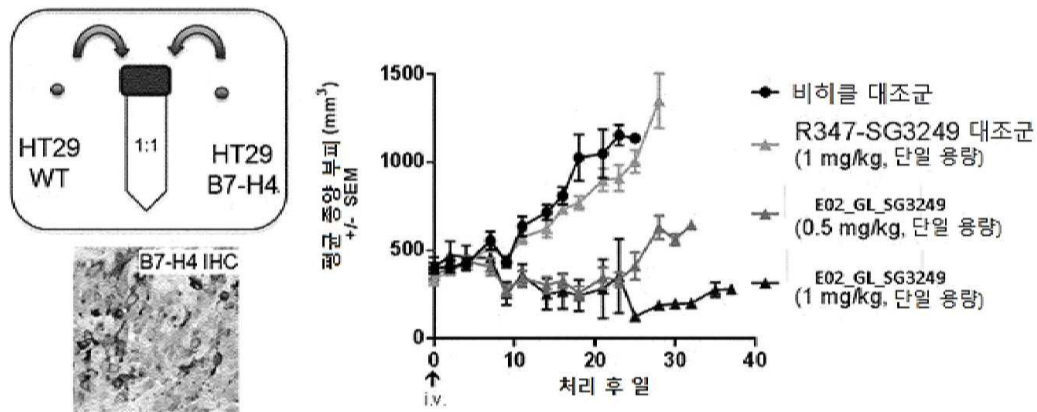
도면21



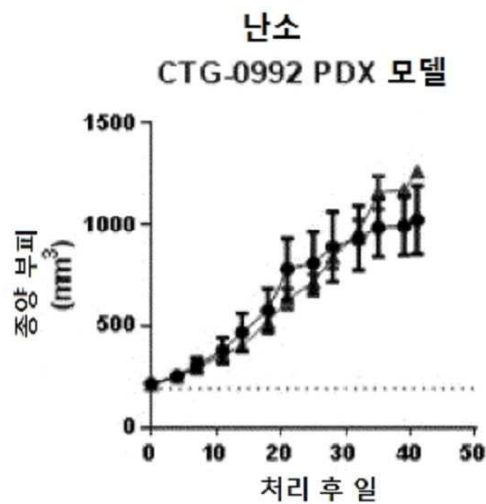
도면22



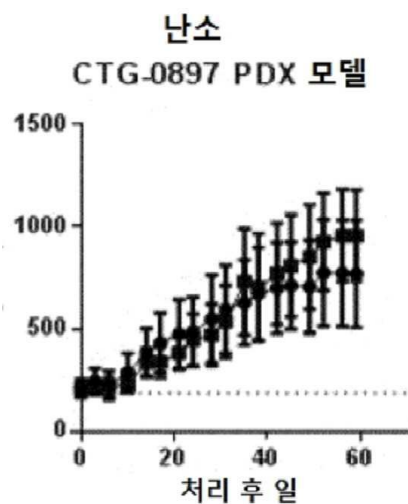
도면23



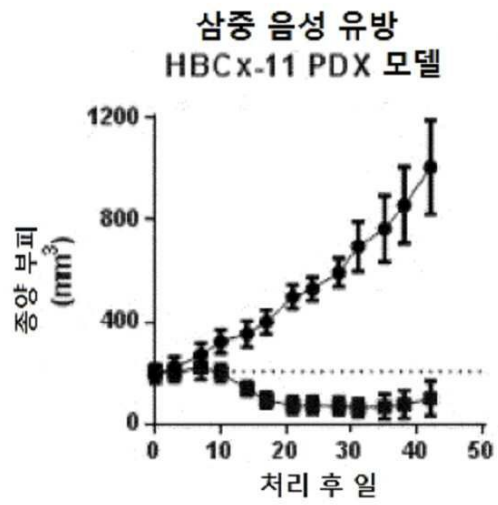
도면24a



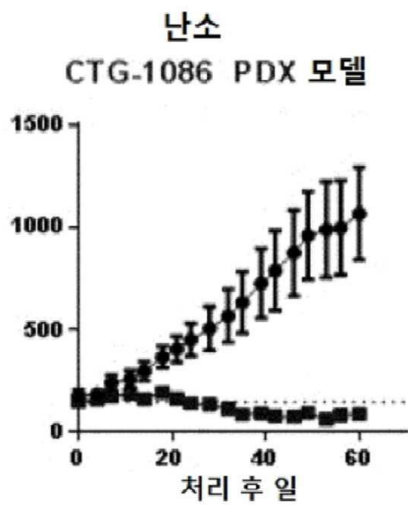
도면24b



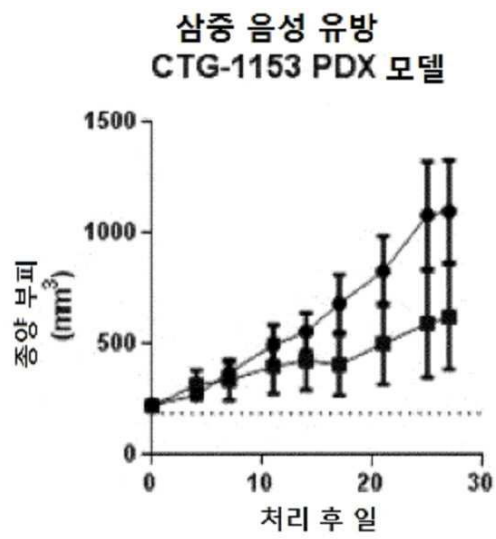
도면24c



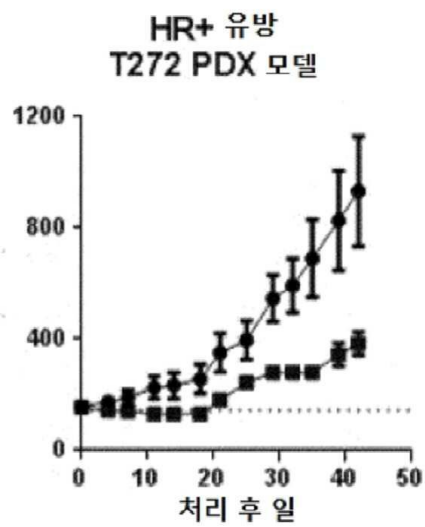
도면24d



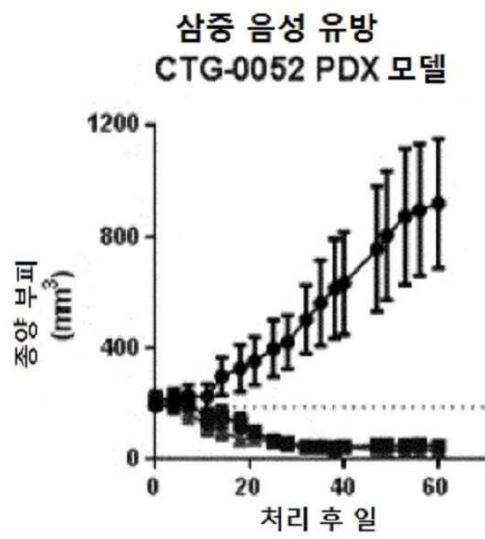
도면24e



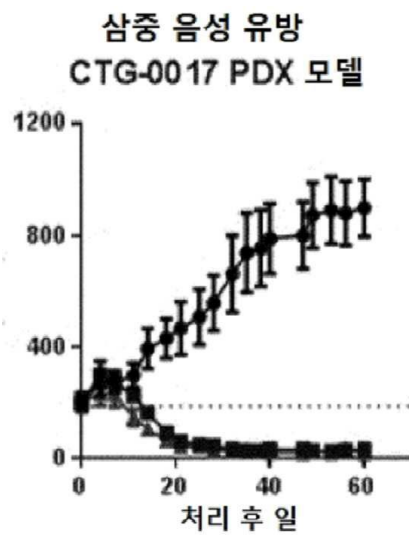
도면24f



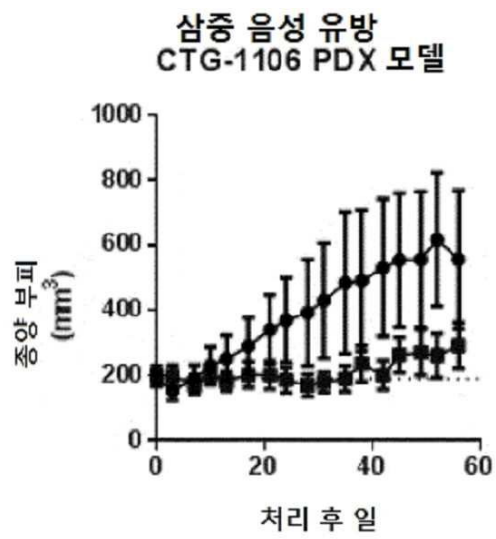
도면24g



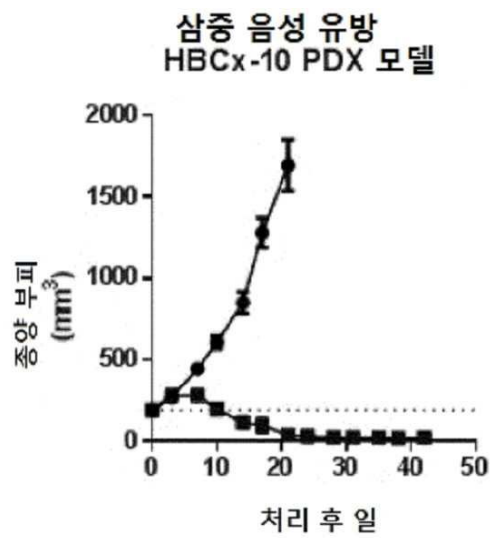
도면24h



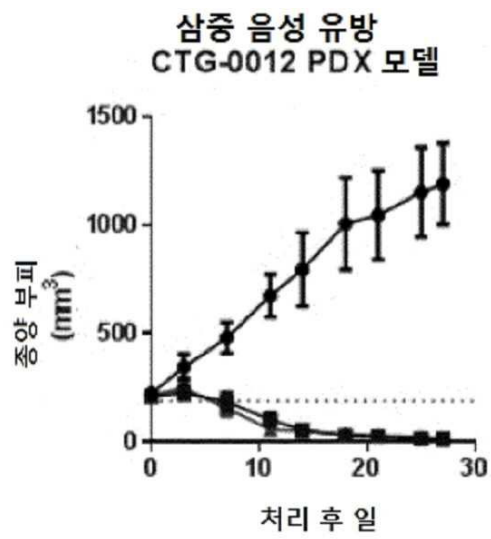
도면24i



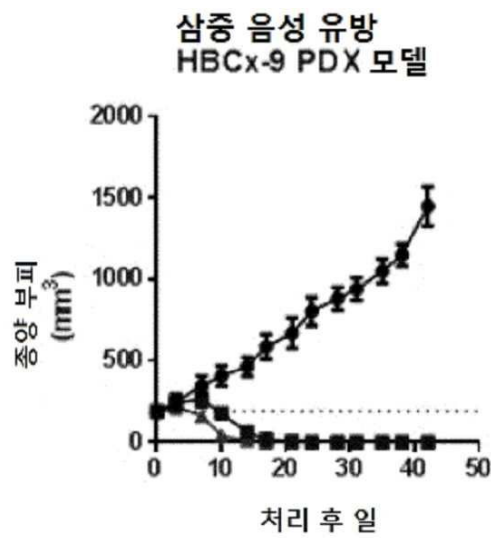
도면24j



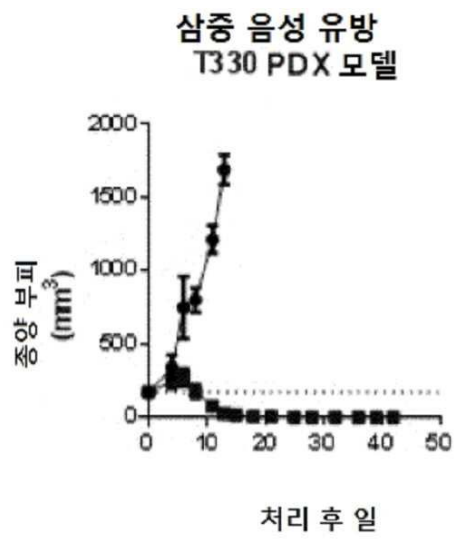
도면24k



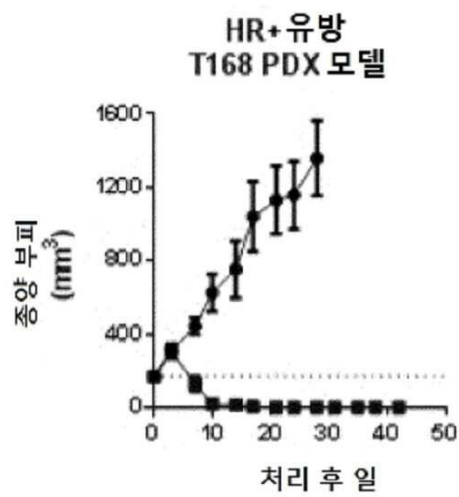
도면24l



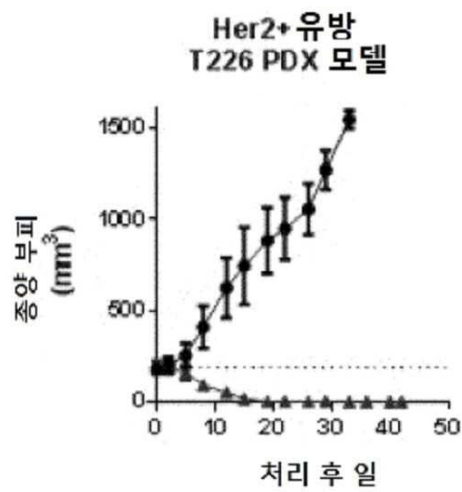
도면24m



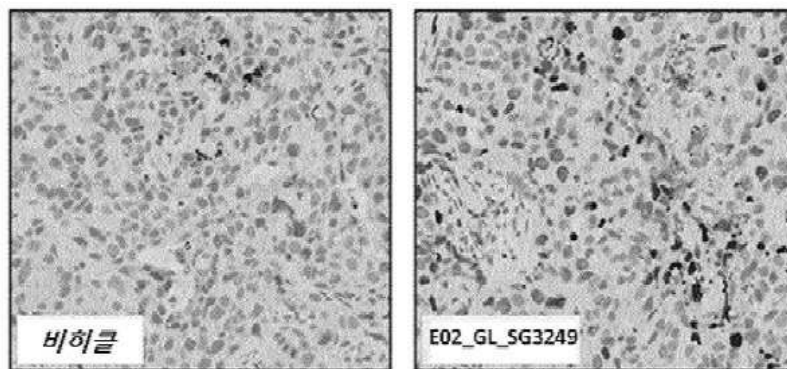
도면24n



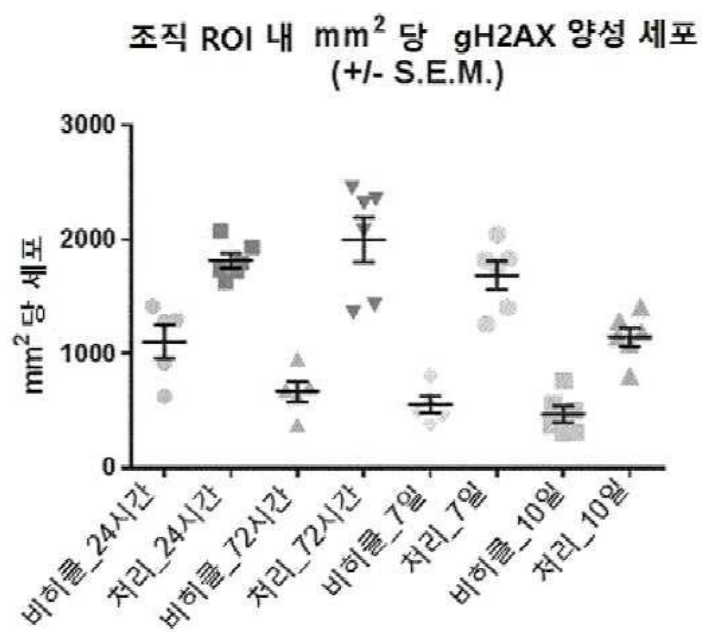
도면24a



도면25

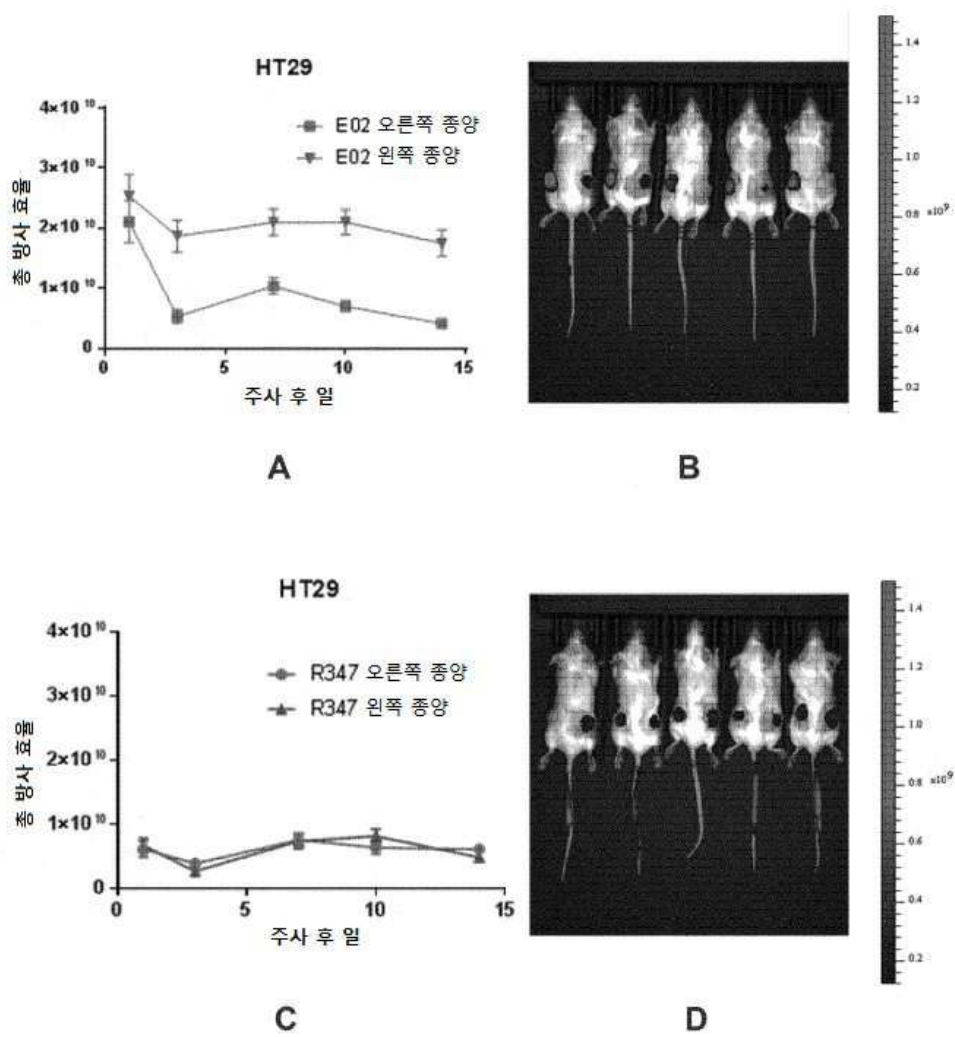


A

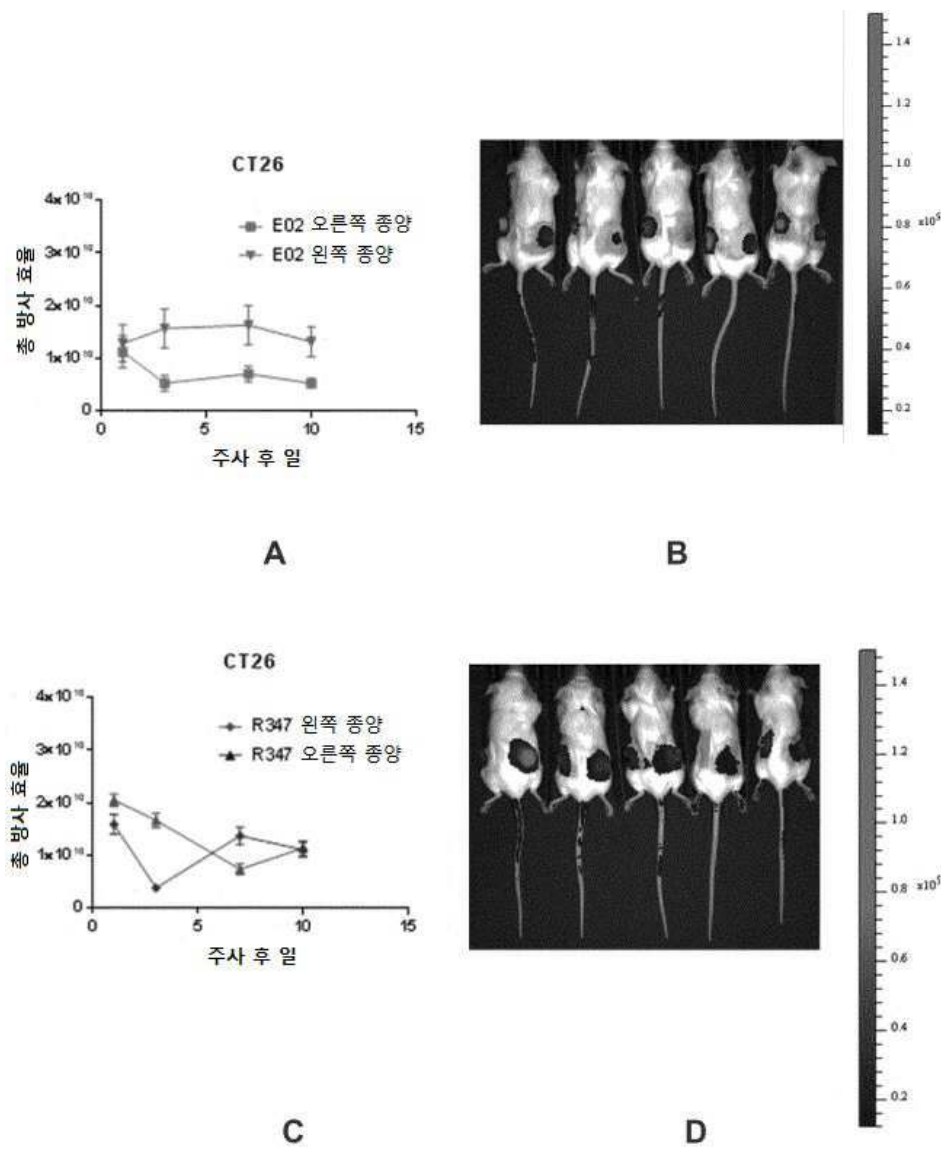


B

도면26



도면27



도면28

클론 ID	중쇄 FW1	중쇄 CDR1	중쇄 FW2
ZY0EPQ-E02	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF	GYWN...	WIRQPPGKGLEWIG
ZY0EQD-E02	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCTVYGGSF	GYWN...	WIRQPPGRGLEWIG
ZY0EP0-C07	QVQLVESGGVLVKPGGSLRLSCAASGFTLS	DYYMS...	WIRQAPGMGLEWVS
ZY0EOB-F05	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDGSIS	SGGYWS...	WIRQHPGKGLEWIG
ZY0EO5-E07	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSIS	SGGYWS...	WIRQHPGKGLEWIG

중쇄 CDR2	중쇄 FW3	중쇄 CDR3	중쇄 FW4
EIN.....HSGSTNYNPSLKS	RVTLVDTSKNQFSLKLSSV..TAADTAVYYCAR	NLYNWINL.....DS	WGQGTLLTVSS
EIN.....HSGSTSYNPSLKS	RITISIDTSKNQFSLKLSSV..TAADTAVYYCAR	VLYNWINV.....DS	WGQGTLLTVSS
YISS.....SGSTIYYTDSVKG	RFTISRDSAKNSLYLQMNSL..RAEDTAVYYCAR	DGVGF.....DY	WGQGTLLTVSS
NIY.....YSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLNSV..TAADTAVYYCAT	EKALATVTPSGYENYYTV.....DV	WGQGTLLTVSS
NIY.....YSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSV..TAADTAVYYCAR	EKALASVIPSGYENYYV.....DV	WGQGTLLTVSS

A

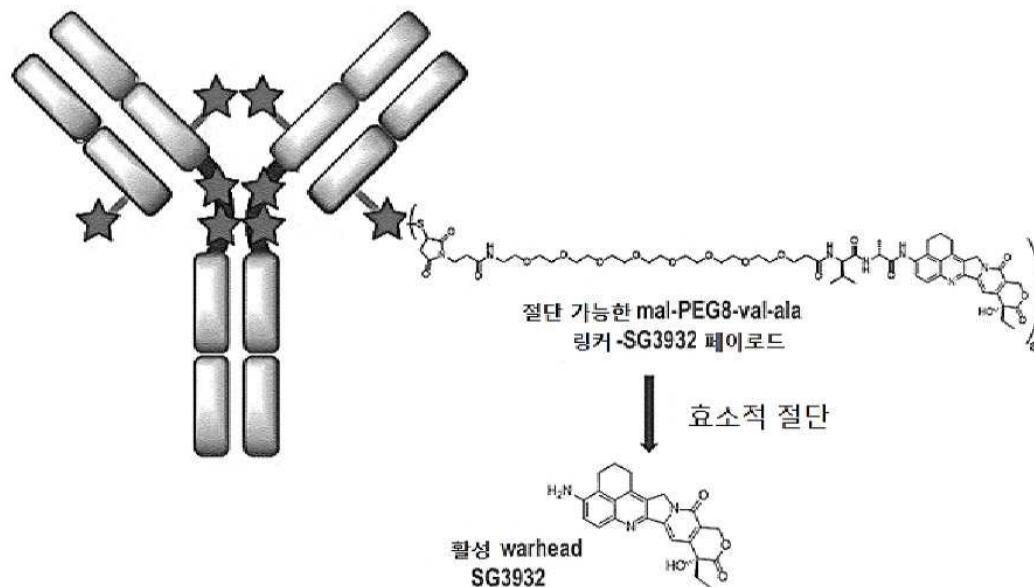
클론 ID	경쇄 FW1	경쇄 CDR1	경쇄 FW2
ZY0EQD-E02	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQ.....DIRNDVG	WYQQKPGKAPKRLIY
ZY0EPQ-E02	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQ.....GIRNDLG	WYQQKPGGRAPKRLIY
ZY0EP0-C07	EIVLTQSPGTLSTLFPGERATLSC	RASQS.....VSSSYLA	WYQQKPGQSPRLIY
ZY0EO5-E07	DIQLTQSPSFLSASVGGRVTTC	WASQ.....GIAGYLA	WYQQKPGKAPKLLIY
ZY0EOB-F05	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTC	WASQ.....GISSYLA	WYQQKPGKAPKLLIY

경쇄 CDR2	경쇄 FW3	경쇄 CDR3	경쇄 FW4
AA.....SRLQS	GVPSRFGSGSGSG..TEFTLTISLQPEDFATYYC	LQHNSYP.....RT	FGQGTKVEI...K
VA.....SSLQS	GVPSRFGSGSGSG..TEFTLTISLQPEDFATYYC	LQHNSYP.....RT	FGQGTKVEI...K
AA.....SSRAT	GIPDRFSGSGSGSG..TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSSPL.....YT	FGQGTKLEI...K
AA.....STLQS	GVPSRFGSGSGSG..TEFTLTISLQPEDFATYYC	QHLNSYP.....LT	FGGGTKVEI...K
AA.....STLQS	GVPSRFGSGSGSG..TEFTLTISLQPEDFATYYC	QHLNSYP.....LT	FGGGTKVEI...K

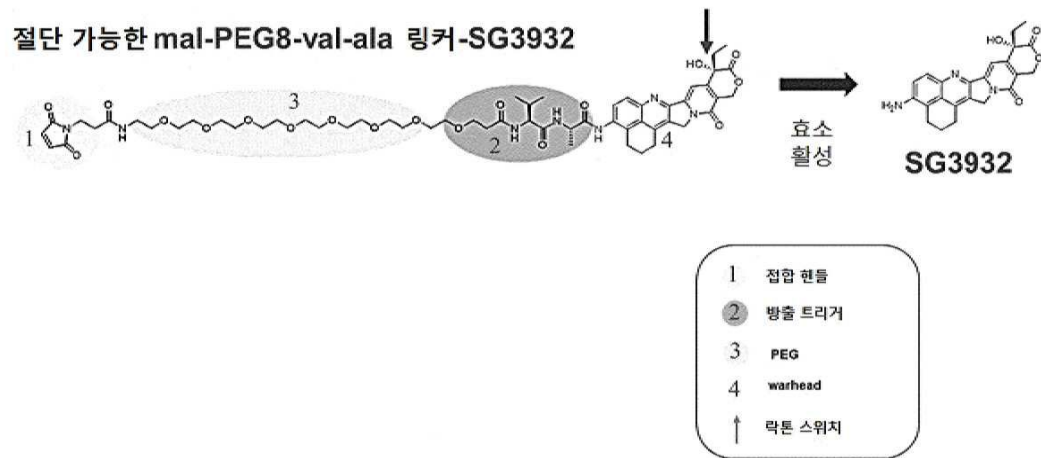
B

도면29a

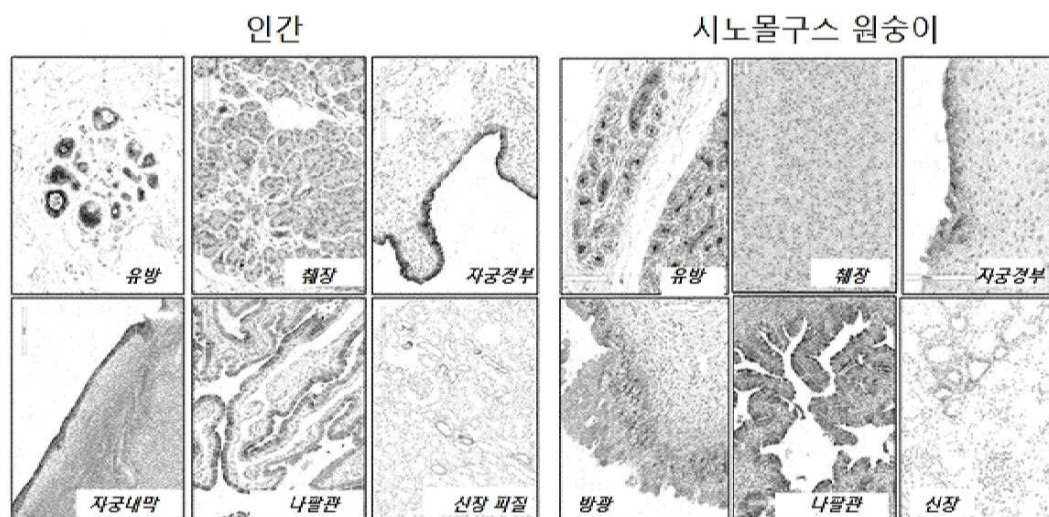
E02-GL-SG3932: B7-H4 표적화 TOP1i-ADC



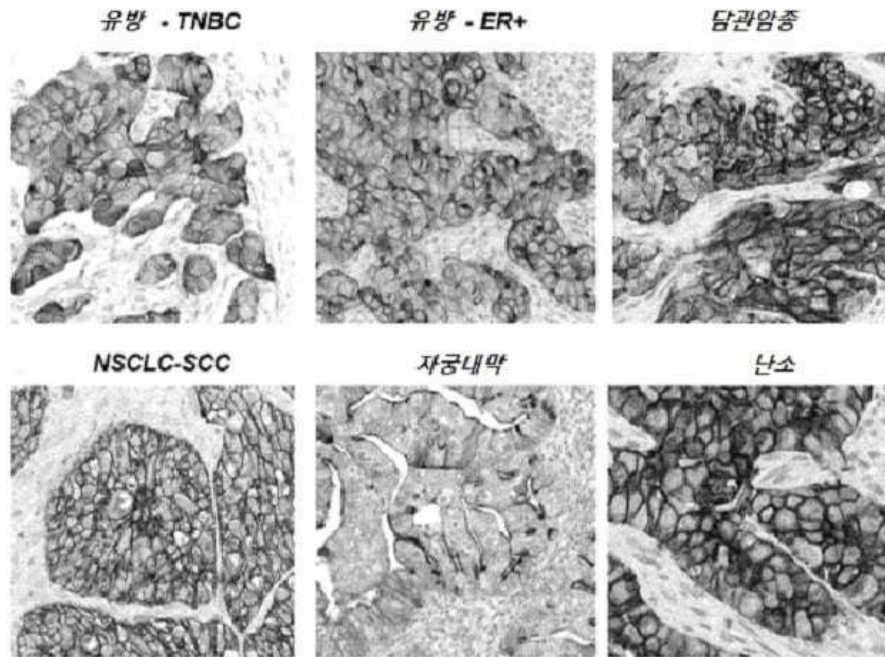
도면29b



도면30



도면31



ER: 에스트로겐 수용체; NSCLC-SCC: 비소세포 폐암, 편평세포 암종; TNBC: 삼중 음성 유방암.

도면32

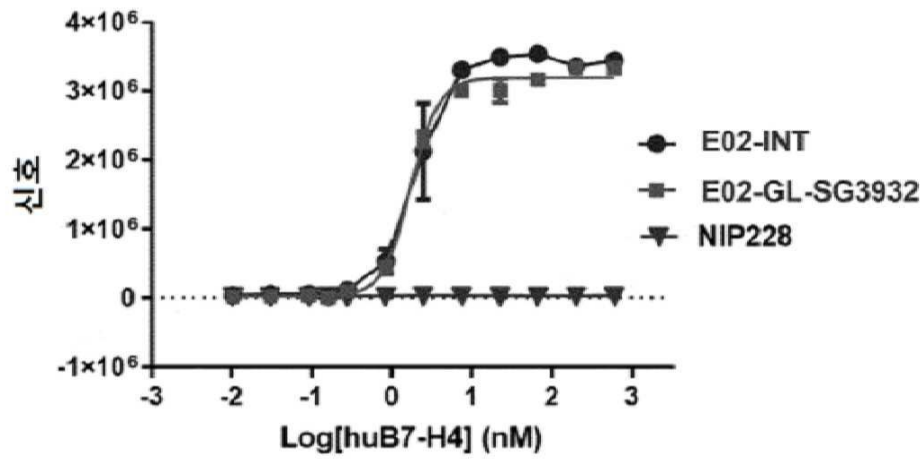
전역 단백질 정렬, 기준 분자: h87-H4 (VICN1), 영역 1 내지 282
서열: 5. 스코어링 매트릭스: BLOSUM 62

서열 뷰: 유사성 형식, 불일치 뒤의 색상

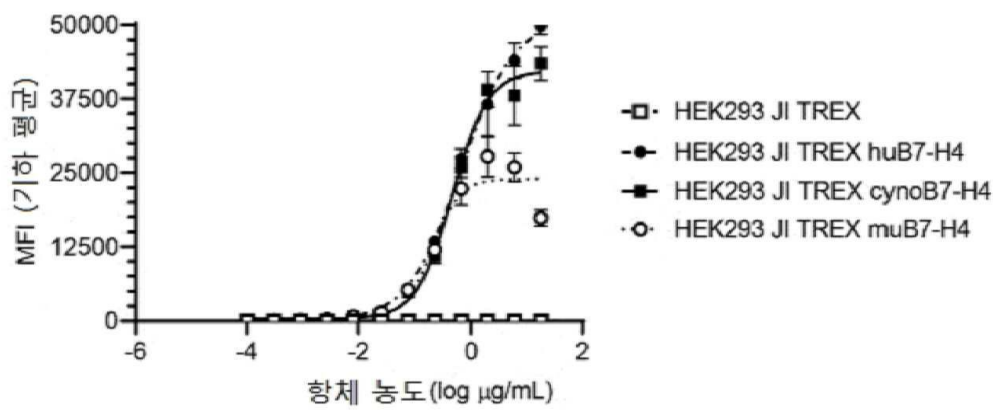
h87-H4 (VICN1)	1	maslqqlfwsiiisiiilagaia	liigfgisgrhsitvttvasagnigedgilscctfepdiklsdiviqwikegvlglv
cy87-H4 (VICN1)	1	maslqqlfwsiiisiiilagaia	liigfgisgrhsitvttvasagnigedgilscctfepdiklsdiviqwikegvlglv
rh87-H4 (VICN1)	1	maslqqlfwsiiisiiilagaia	liigfgisgrhsitvttvasagnigedgilscctfepdiklsdiviqwikegvlglv
m87-H4 (VICN1)	1	maslqqlfwsiiisiiilagaia	liigfgisgrhsitvttvasagnigedgilscctfepdiklsdiviqwikegvlglv
r87-H4 (VICN1)	1	maslqqlfwsiiisiiilagaia	liigfgisgrhsitvttvasagnigedgilscctfepdiklsdiviqwikegvlglv
h87-H4 (VICN1)	81	hefkegkdelseqdenfrgrtavfadqvivgnasrlrknvqltdagtykcyiitskqkgnanleyktgafsmpevndyn	
cy87-H4 (VICN1)	81	hefkegkdelseqdenfrgrtavfadqvivgnasrlrknvqltdagtykcyiitskqkgnanleyktgafsmpevndyn	
rh87-H4 (VICN1)	81	hefkegkdelseqdenfrgrtavfadqvivgnasrlrknvqltdagtykcyiitskqkgnanleyktgafsmpevndyn	
m87-H4 (VICN1)	81	hefkegkdelseqdenfrgrtavfadqvivgnasrlrknvqltdagtykcyiitskqkgnanleyktgafsmpevndyn	
r87-H4 (VICN1)	81	hefkegkdelseqdenfrgrtavfadqvivgnasrlrknvqltdagtykcyiitskqkgnanleyktgafsmpevndyn	
h87-H4 (VICN1)	161	assetlrceaprwfpqptvvwasqvddqganfsevsntsfelnsenvtmkvsvlynvtnntyscmiendiakatgdikv	
cy87-H4 (VICN1)	161	assetlrceaprwfpqptvvwasqvddqganfsevsntsfelnsenvtmkvsvlynvtnntyscmiendiakatgdikv	
rh87-H4 (VICN1)	161	assetlrceaprwfpqptvvwasqvddqganfsevsntsfelnsenvtmkvsvlynvtnntyscmiendiakatgdikv	
m87-H4 (VICN1)	161	assetlrceaprwfpqptvvwasqvddqganfsevsntsfelnsenvtmkvsvlynvtnntyscmiendiakatgdikv	
r87-H4 (VICN1)	161	assetlrceaprwfpqptvvwasqvddqganfsevsntsfelnsenvtmkvsvlynvtnntyscmiendiakatgdikv	
h87-H4 (VICN1)	241	teseikrrshlqllnskaslc	v-sffaiswallplapylmk
cy87-H4 (VICN1)	241	teseikrrshlqllnskaslc	v-sffaiswallplapylmk
rh87-H4 (VICN1)	241	teseikrrshlqllnskaslc	v-sffaiswallplapylmk
m87-H4 (VICN1)	241	tdseykrrshlqllnskaslc	v-sffaiswallplapylmk
r87-H4 (VICN1)	241	tdseykrrshlqllnskaslc	v-sffaiswallplapylmk

상자 안 ECD: h: 인간; cy: 시노물구스 원숭아; rh: 레서스 원숭아; m: 마우스; r: 랫트.

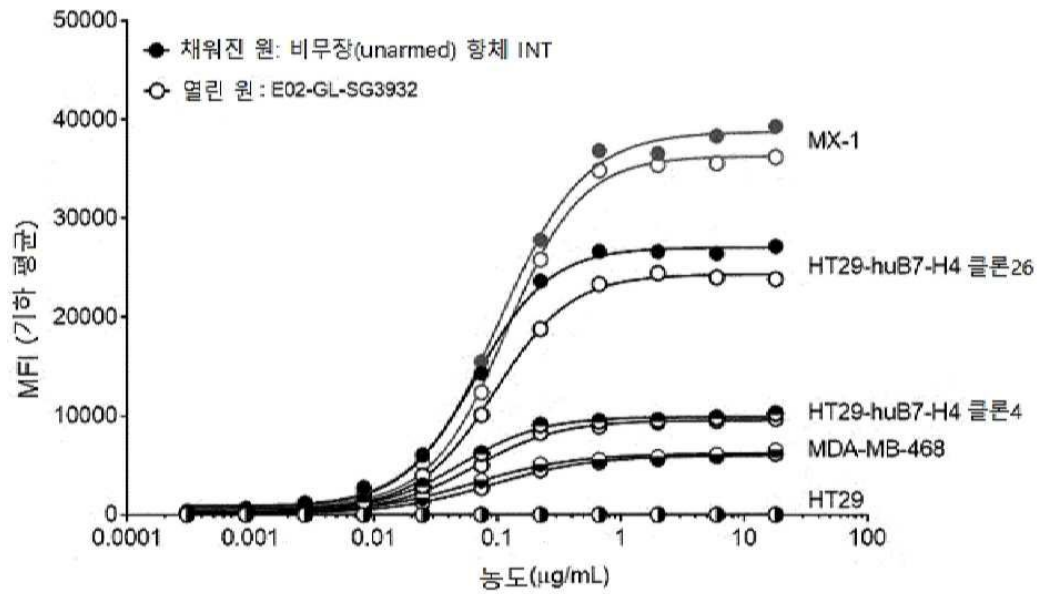
도면33



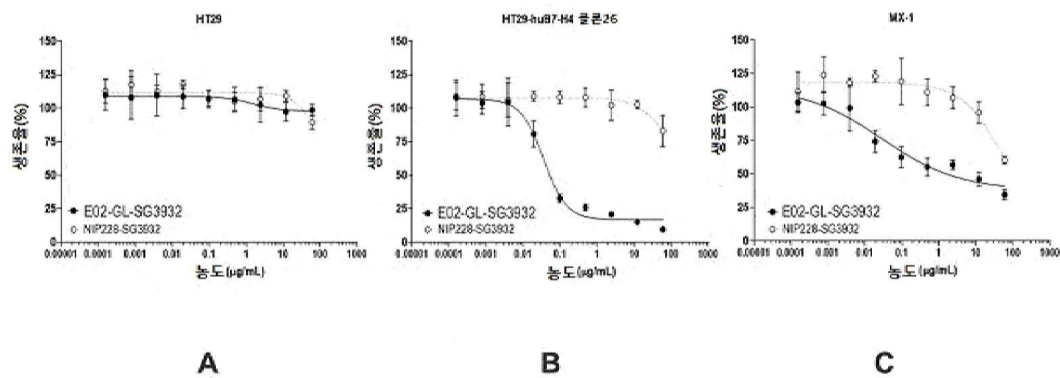
도면34



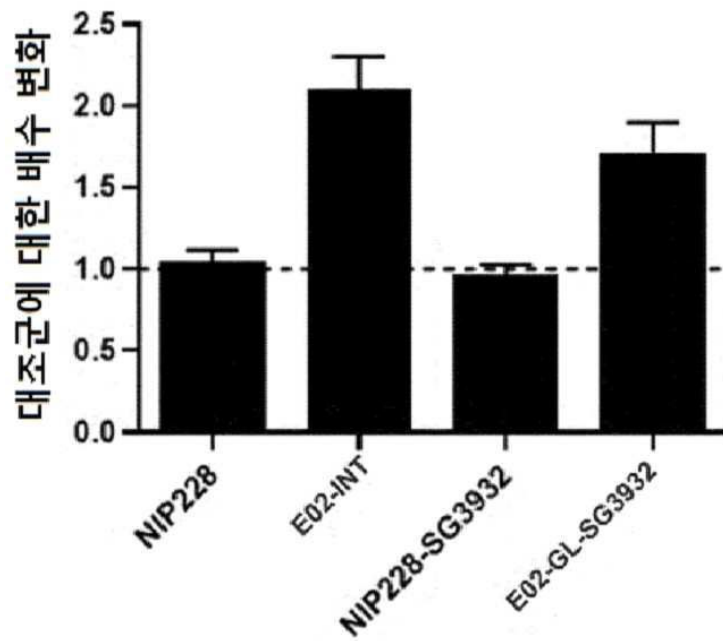
도면35



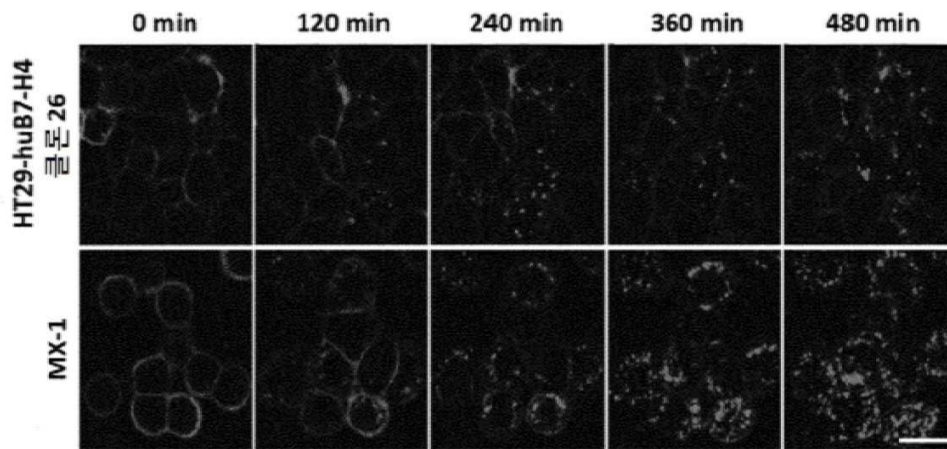
도면36



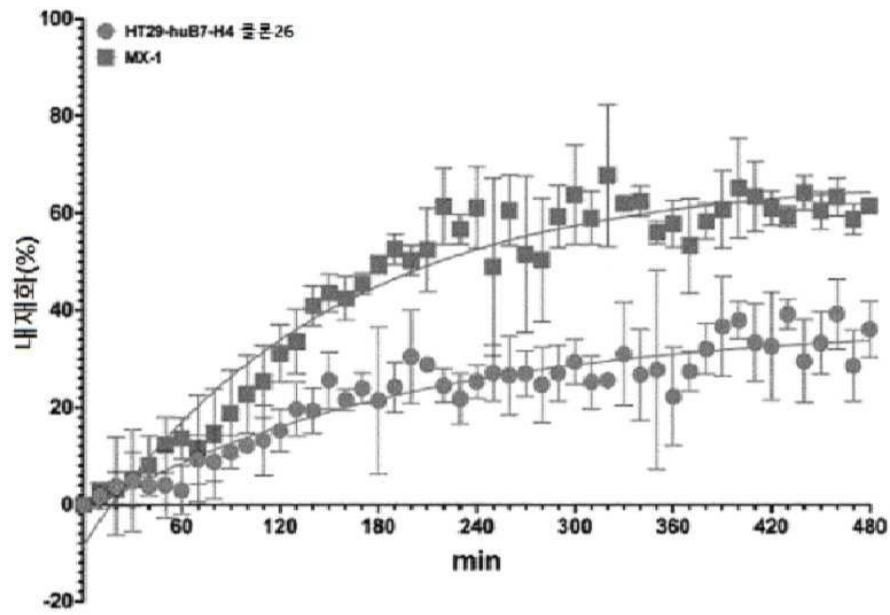
도면37



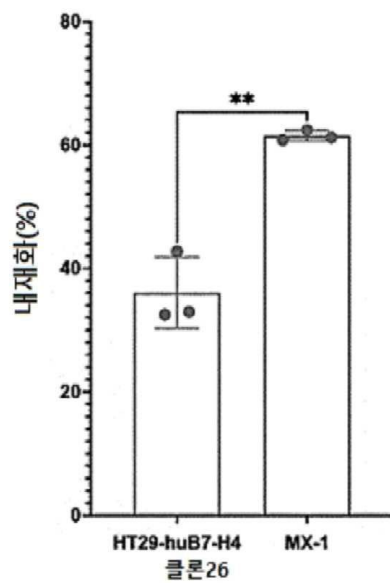
도면38



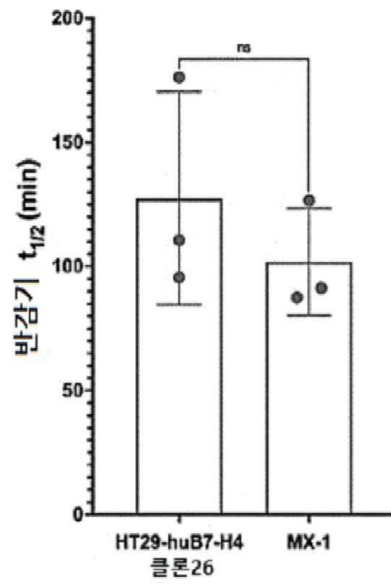
도면39a



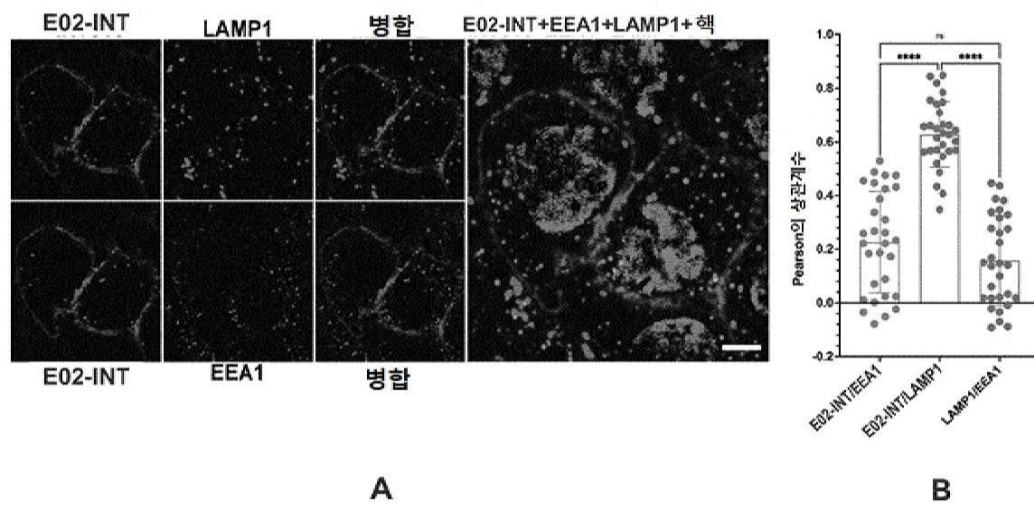
도면39b



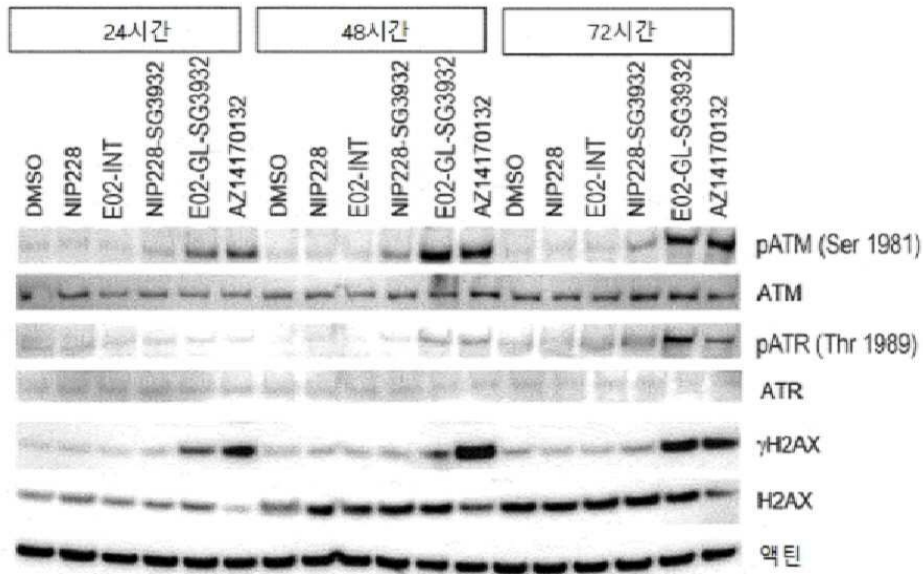
도면39c



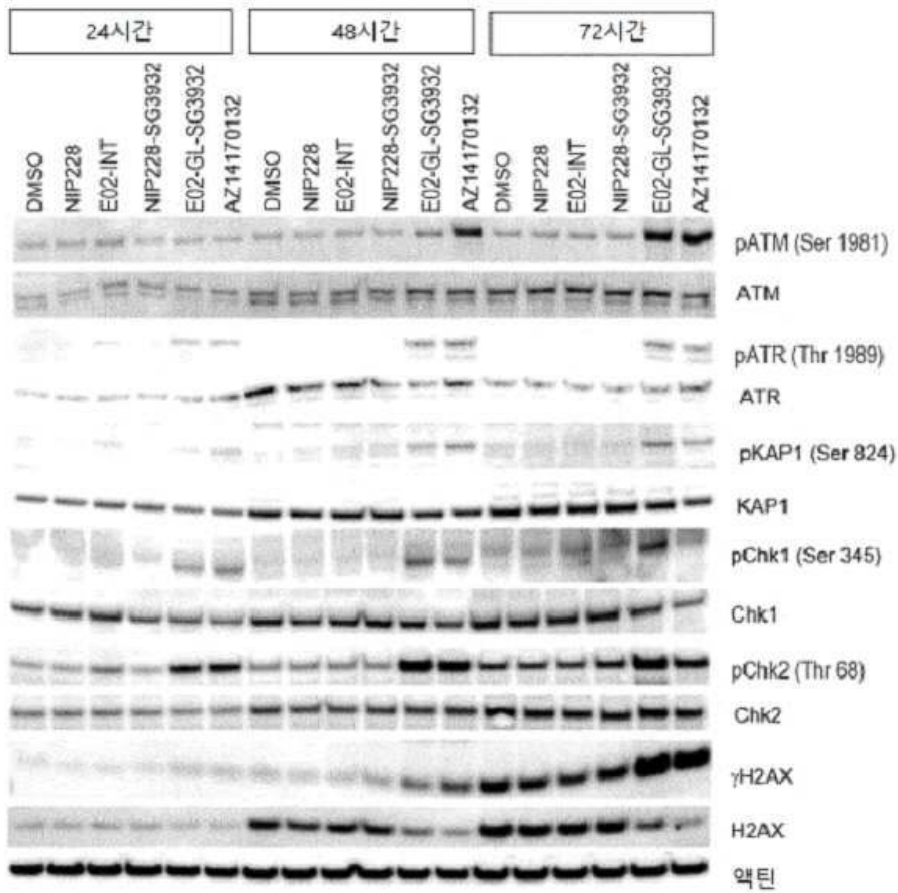
도면40



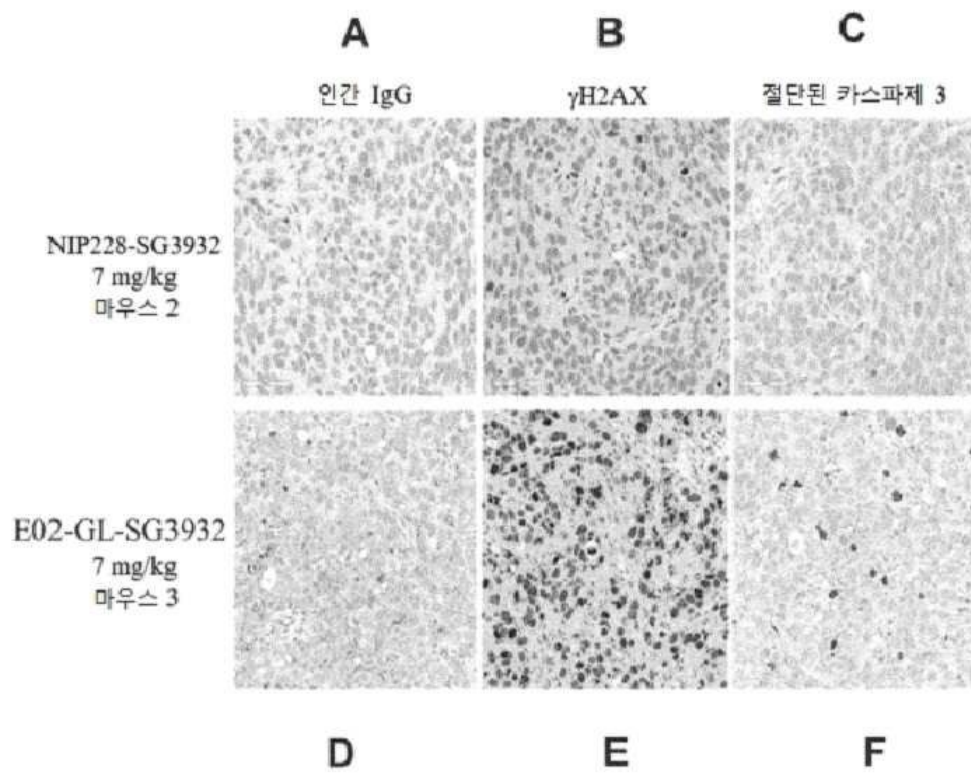
도면41



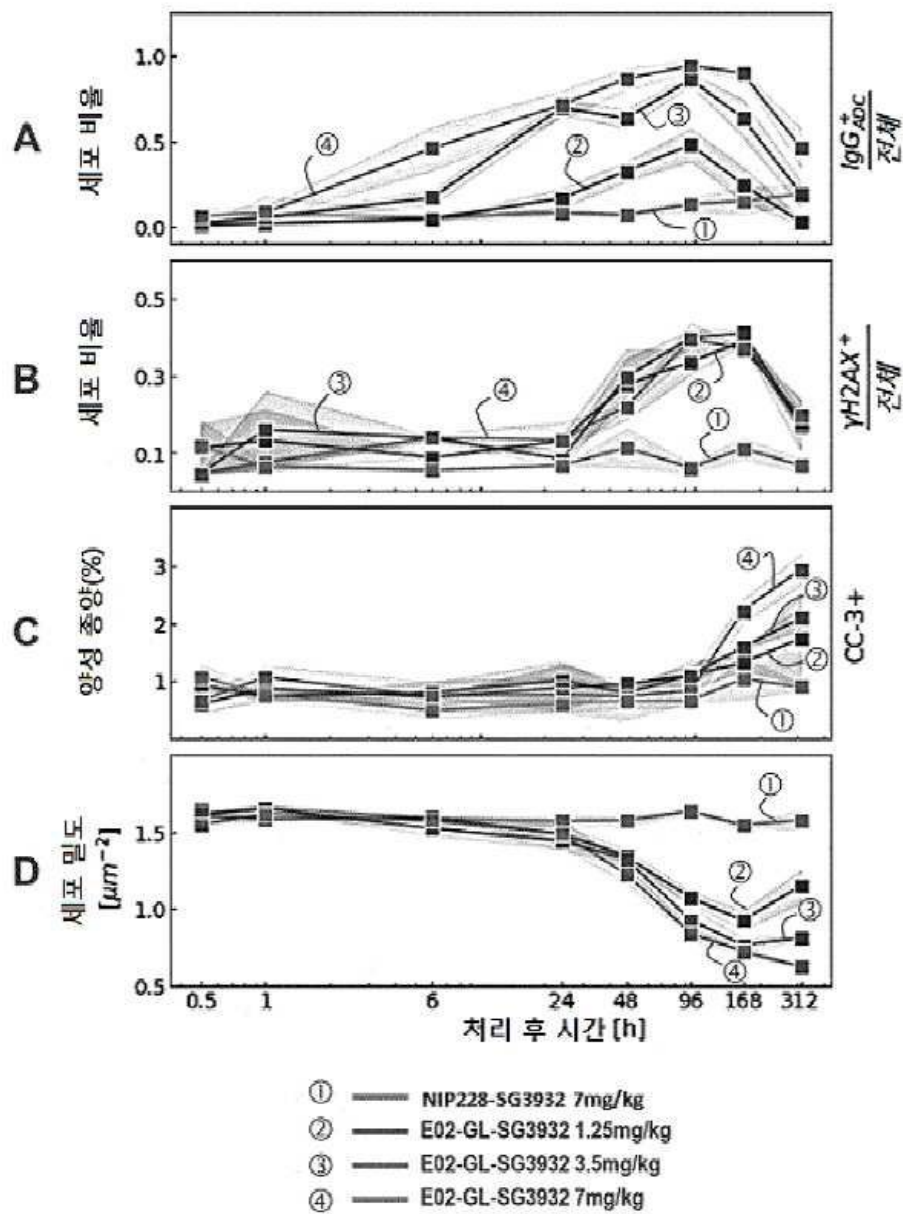
도면42



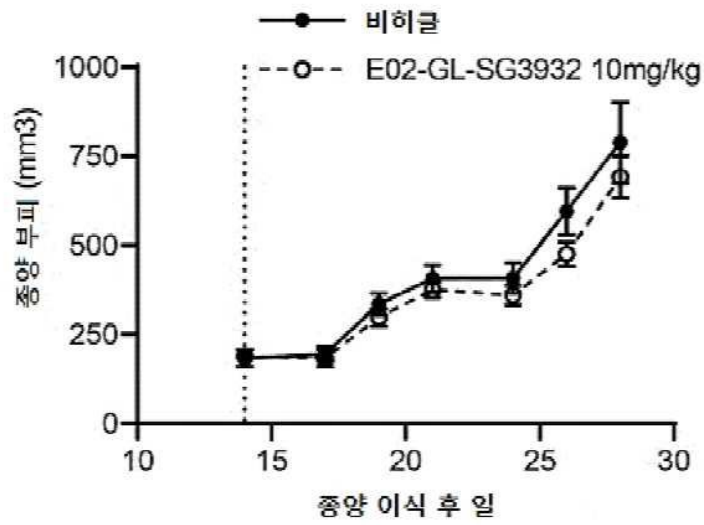
도면43



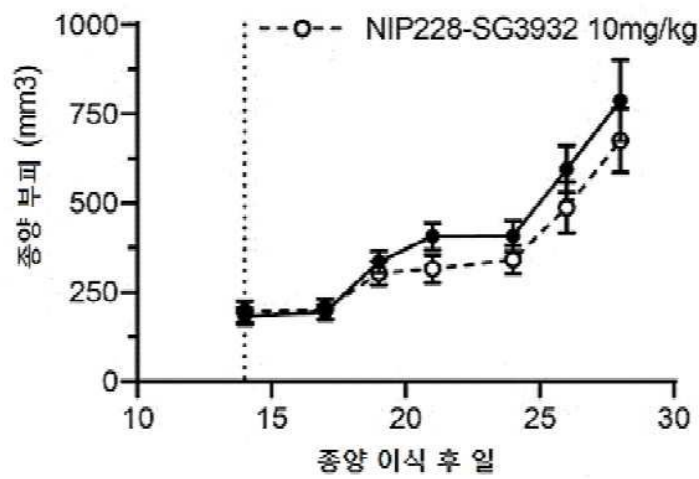
도면44



도면45

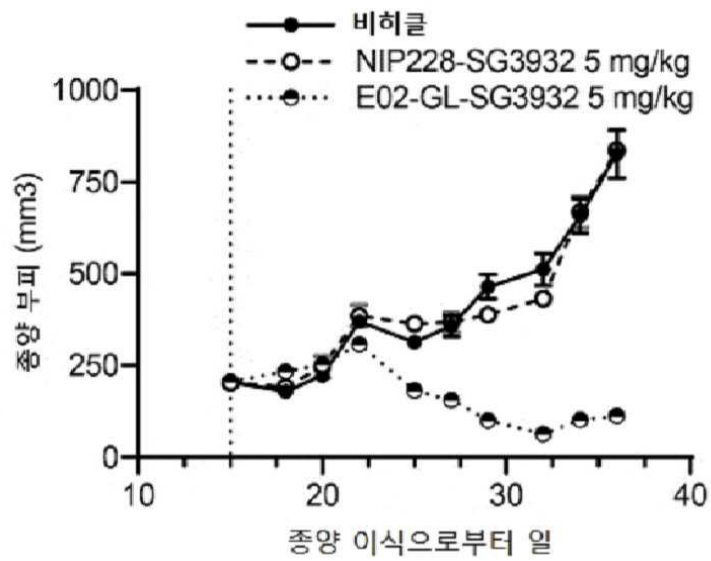


A

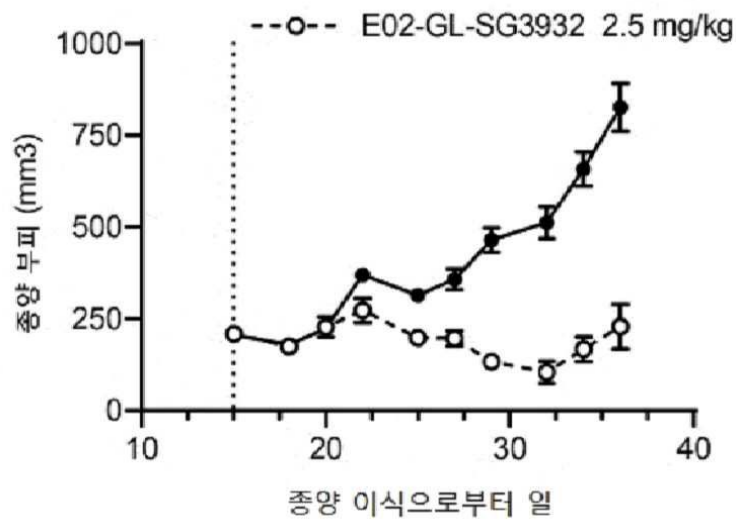


B

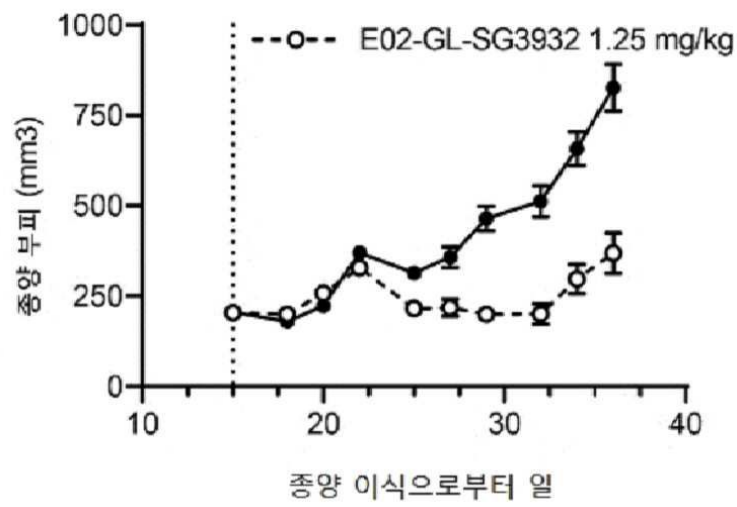
도면46a



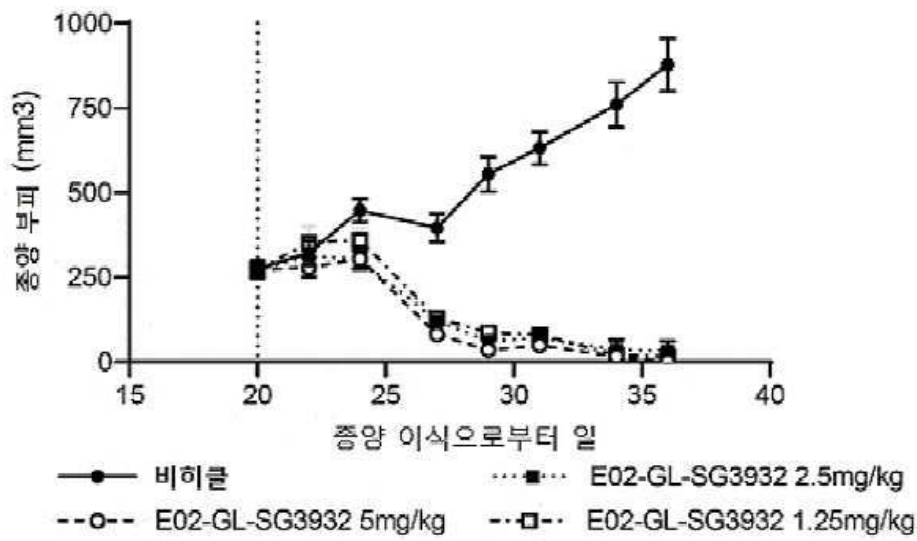
도면46b



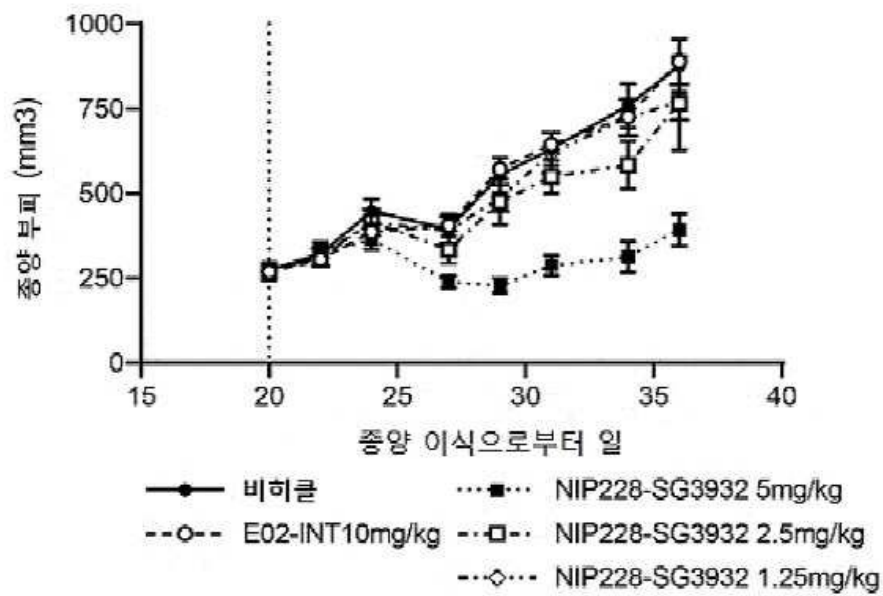
도면46c



도면47

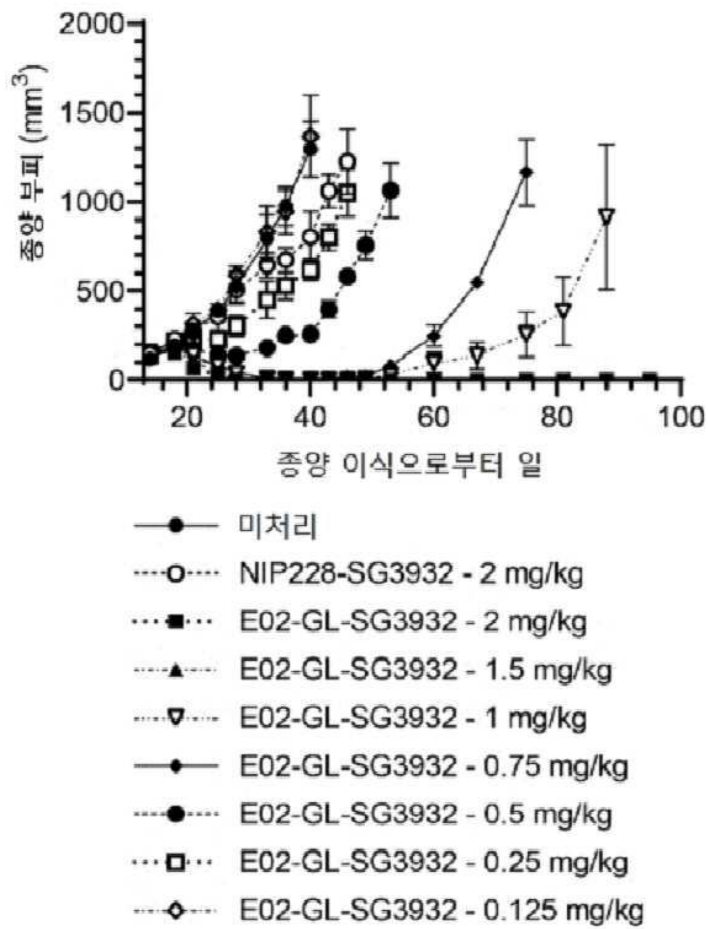


A

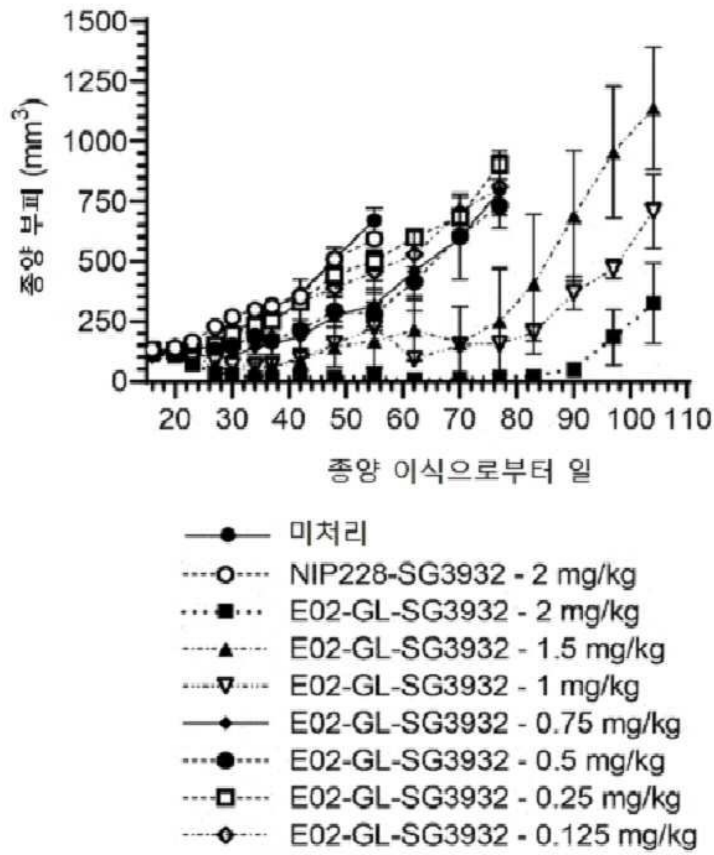


B

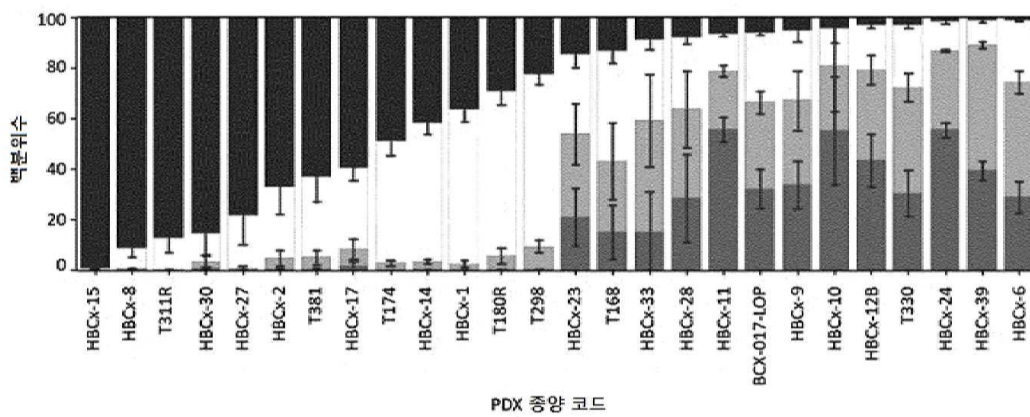
도면48



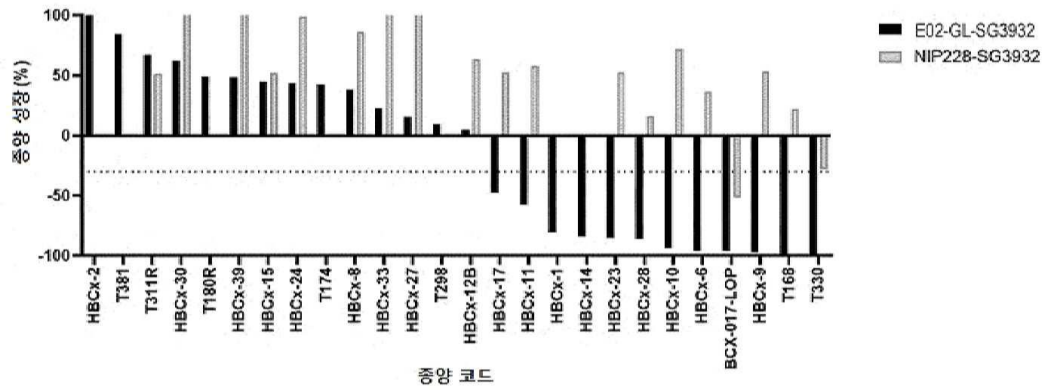
도면49



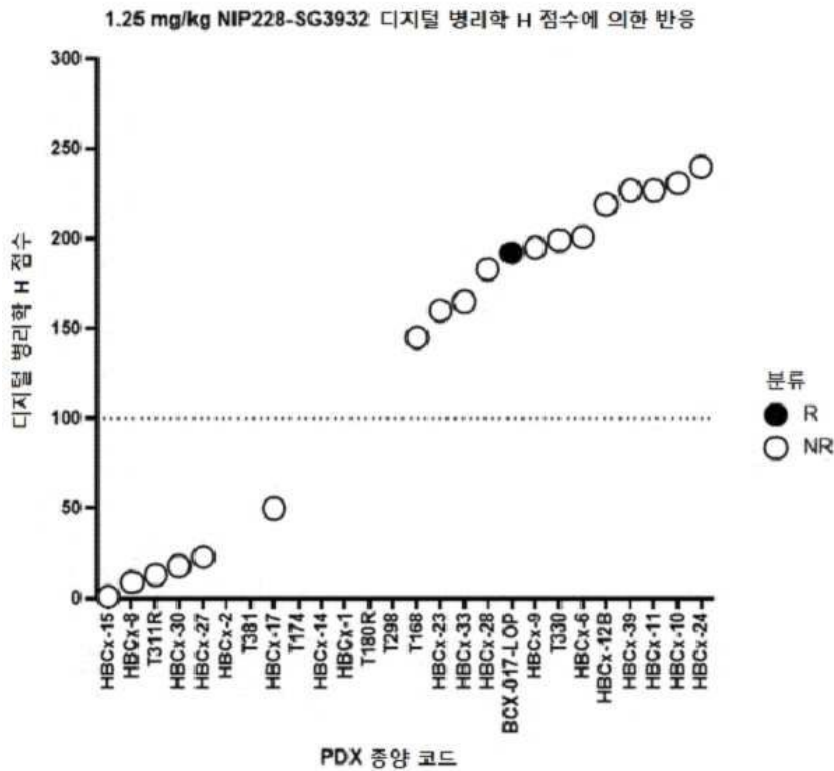
도면50



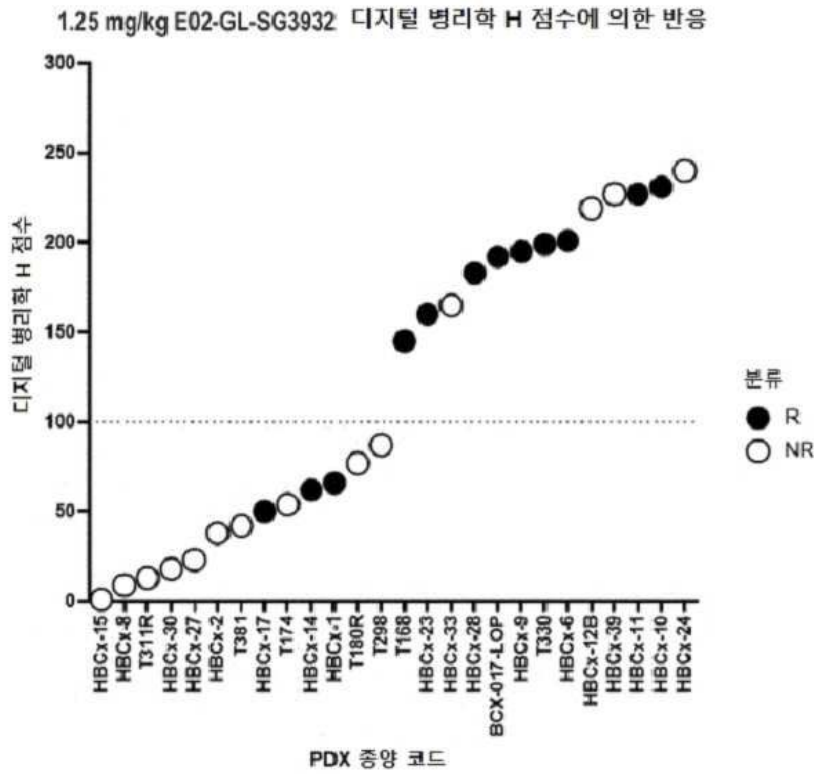
도면51



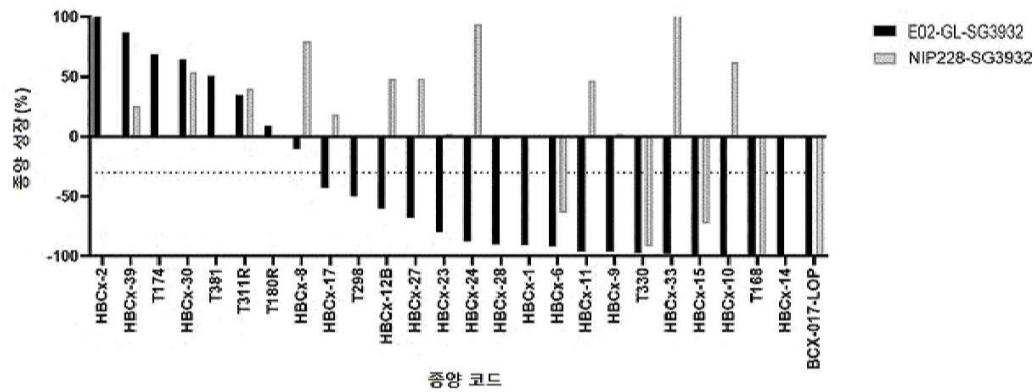
도면52a



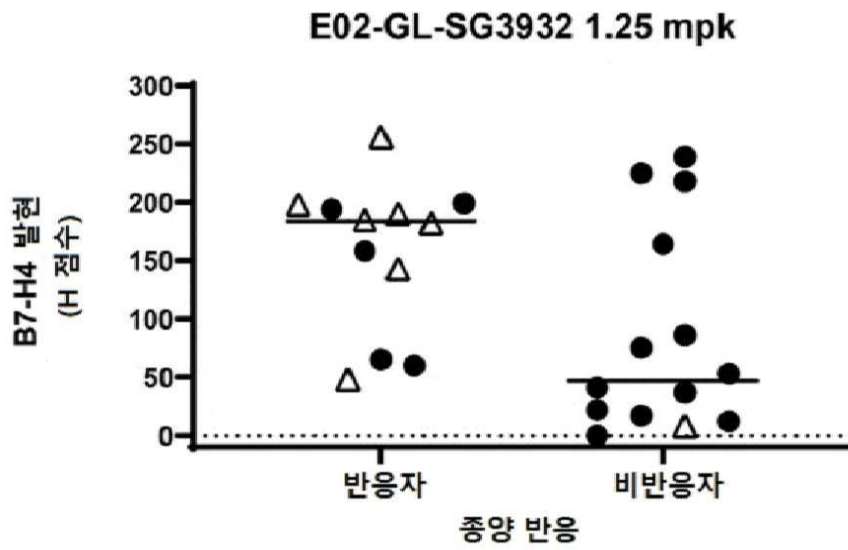
도면52b



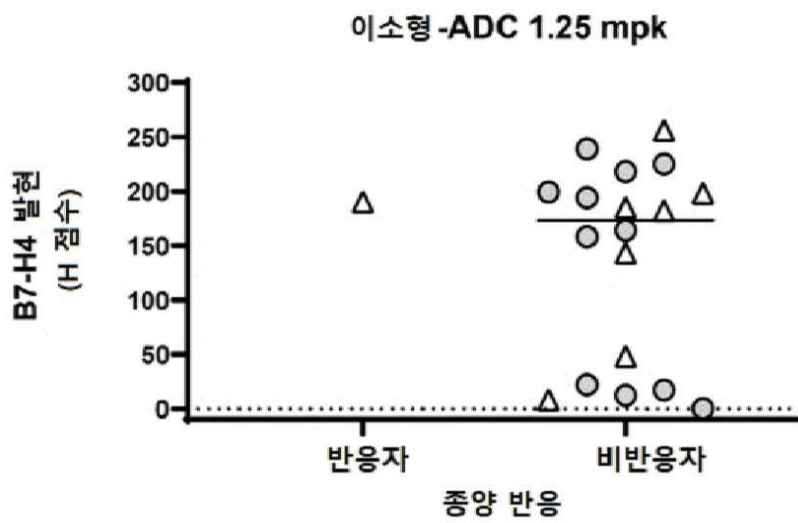
도면53a



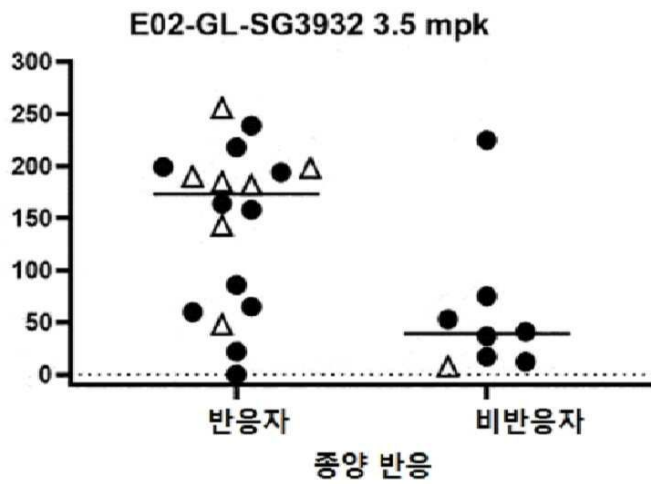
도면53b



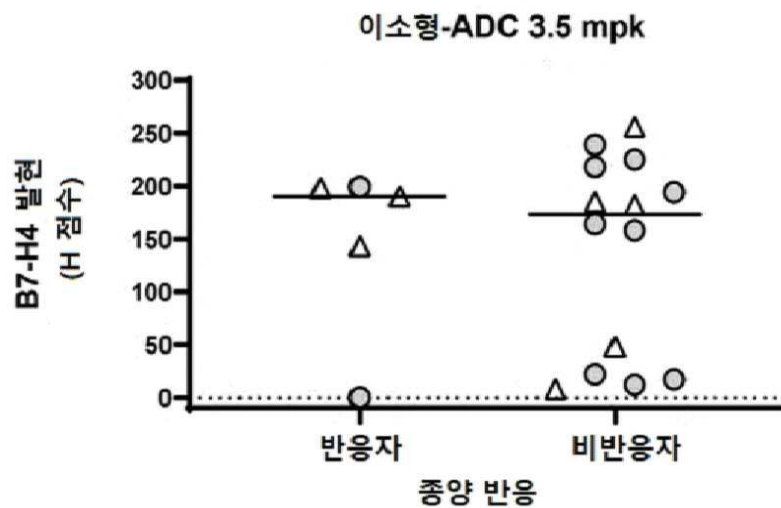
도면53c



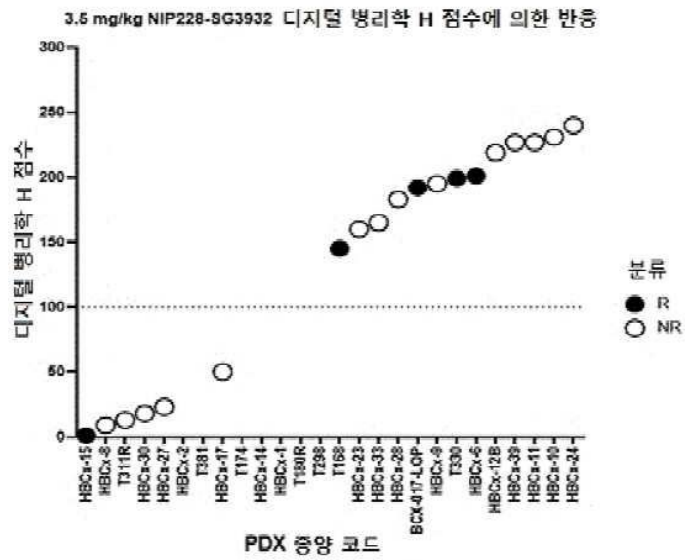
도면53d



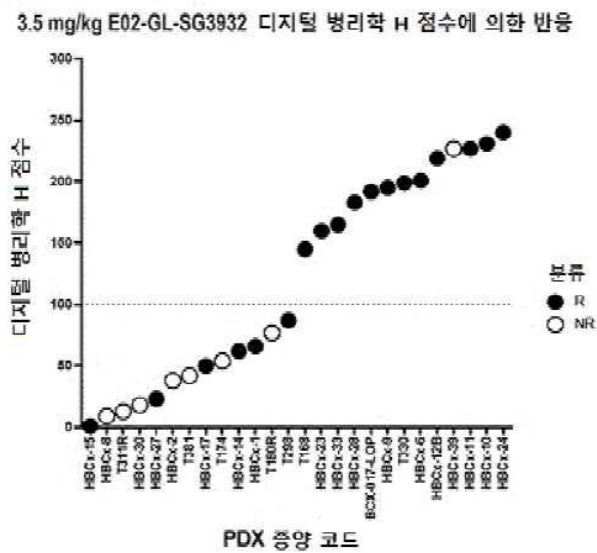
도면53e



도면54

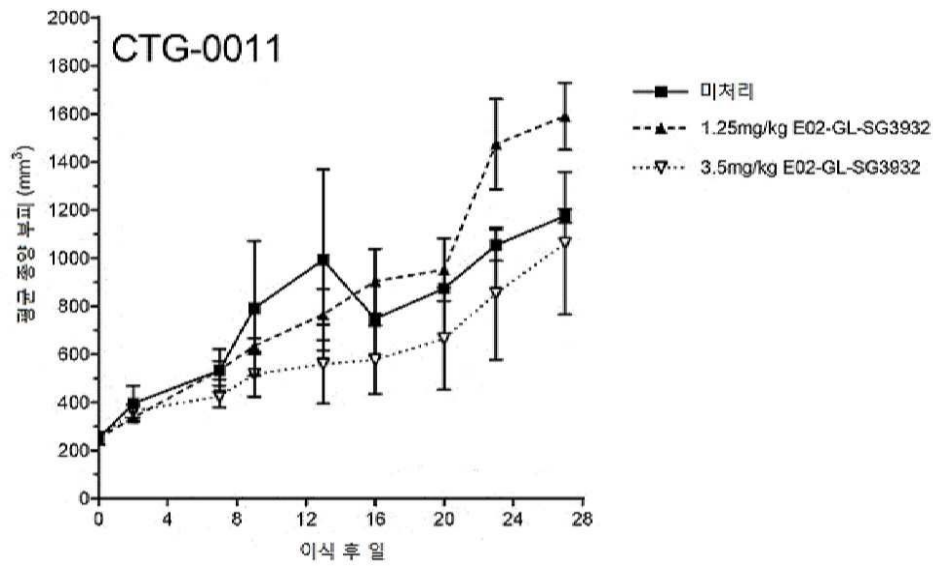


A

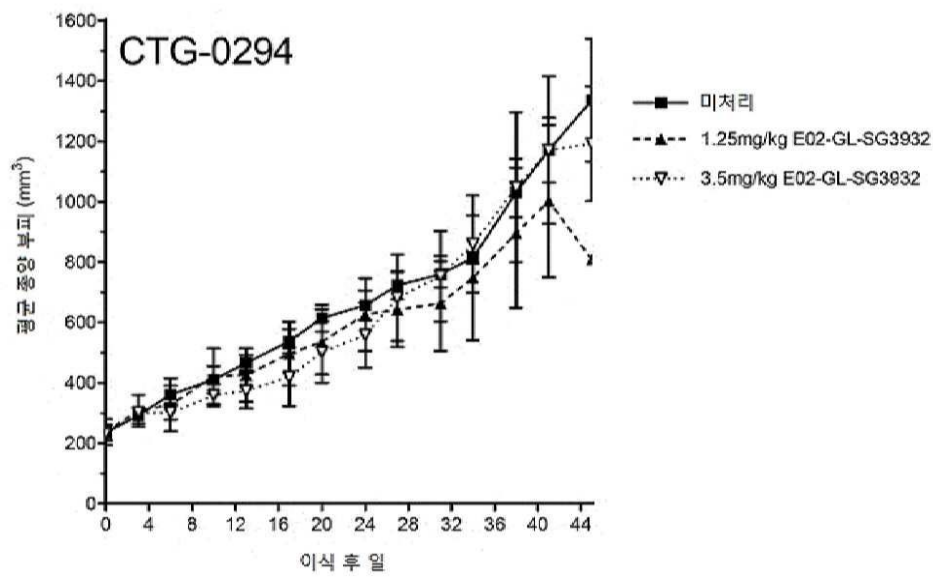


B

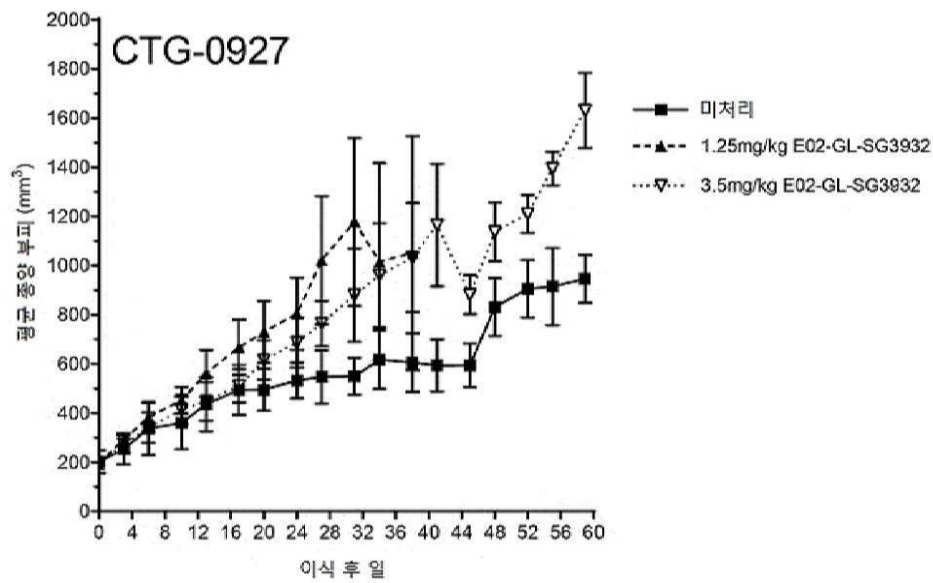
도면55a



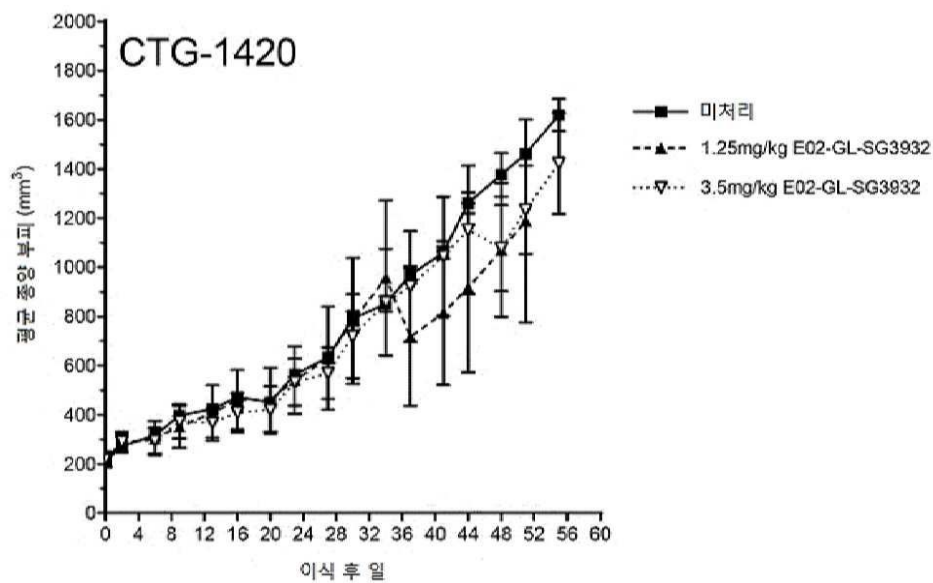
도면55b



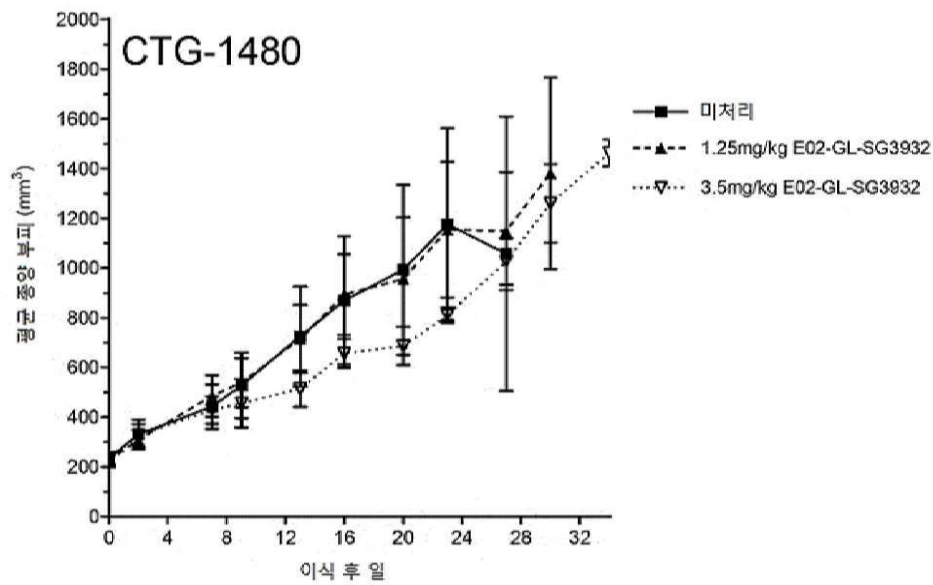
도면55c



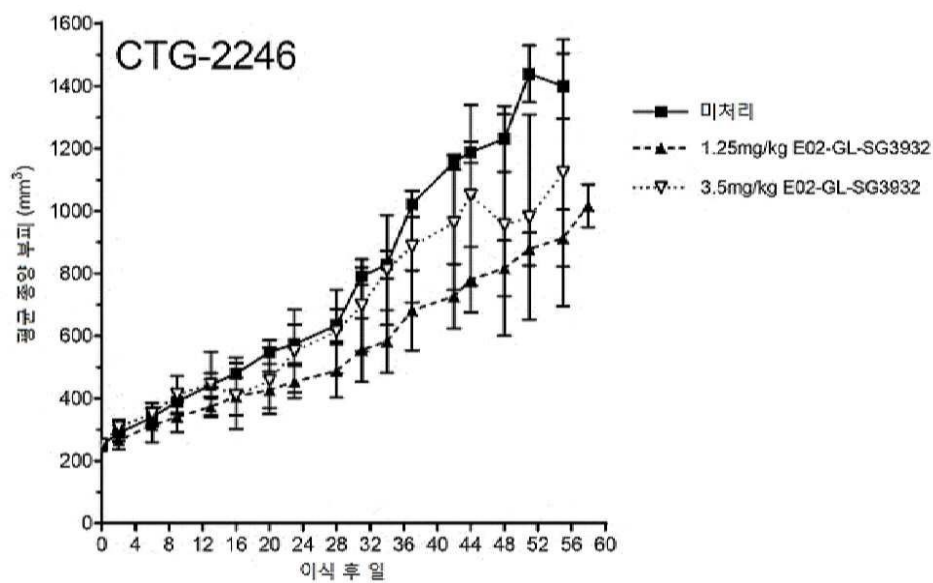
도면55d



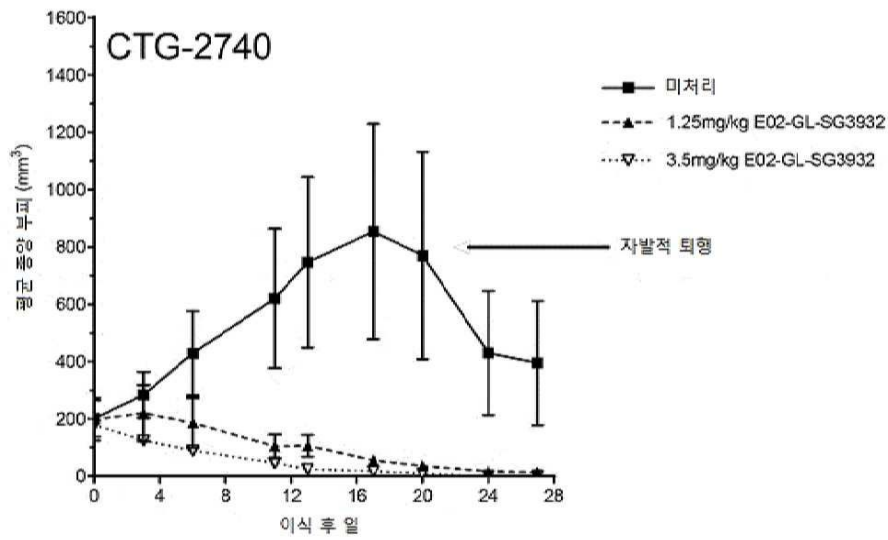
도면55e



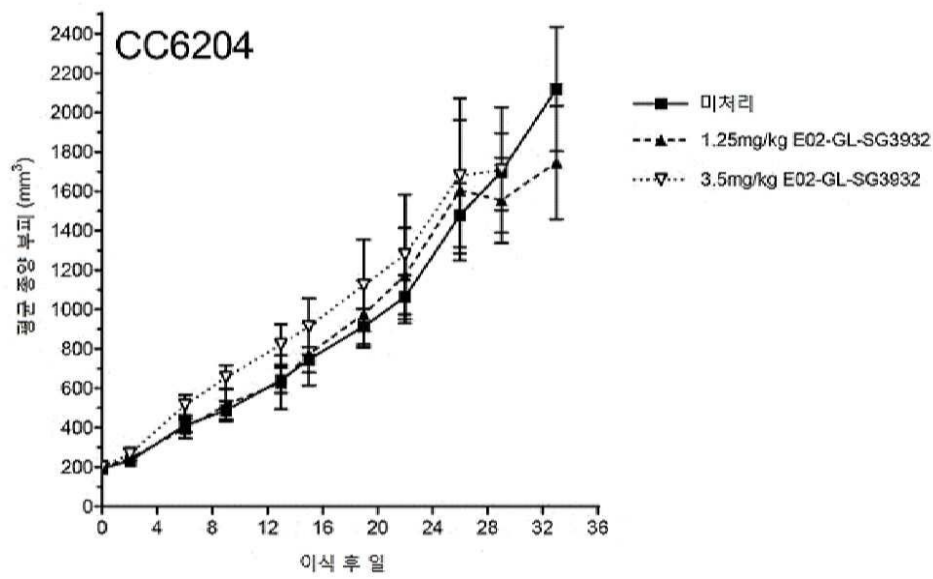
도면55f



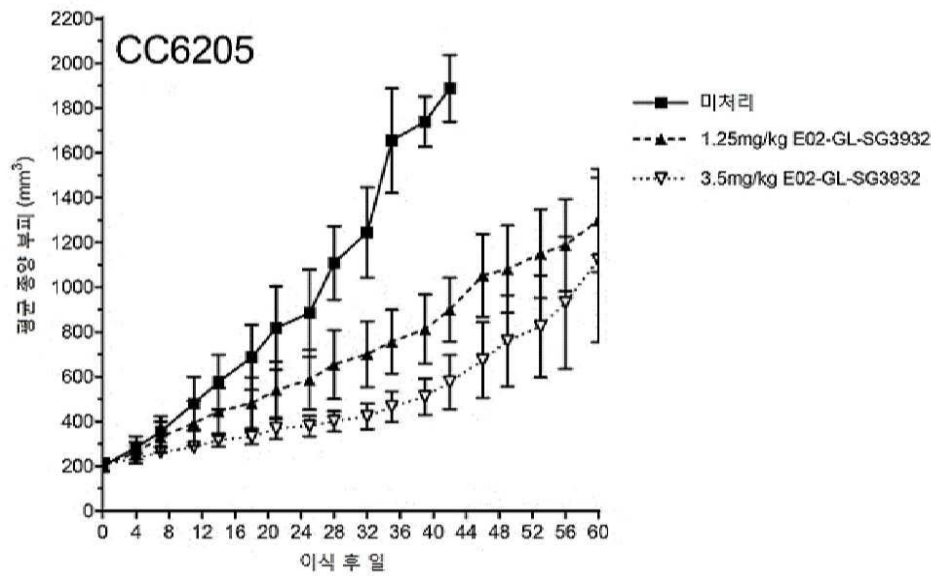
도면55g



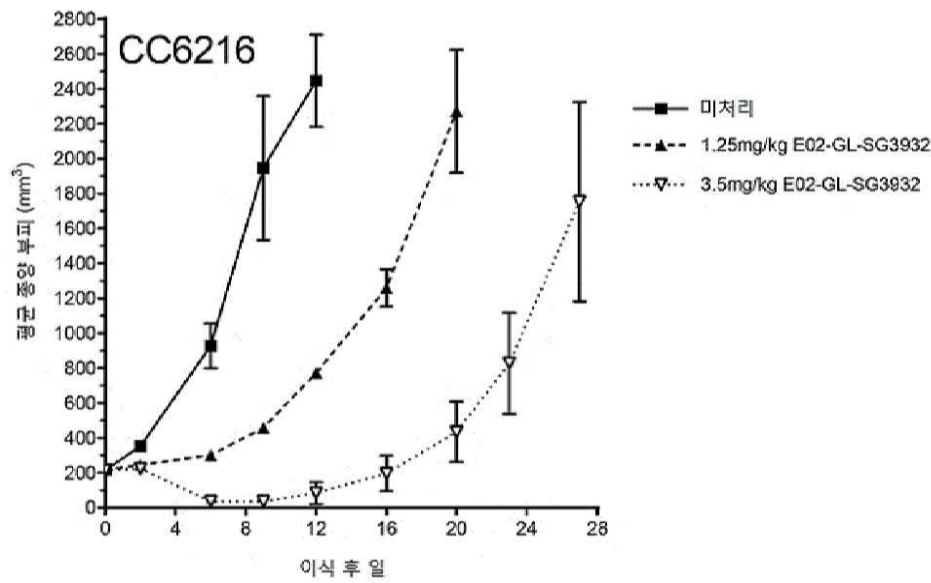
도면56a



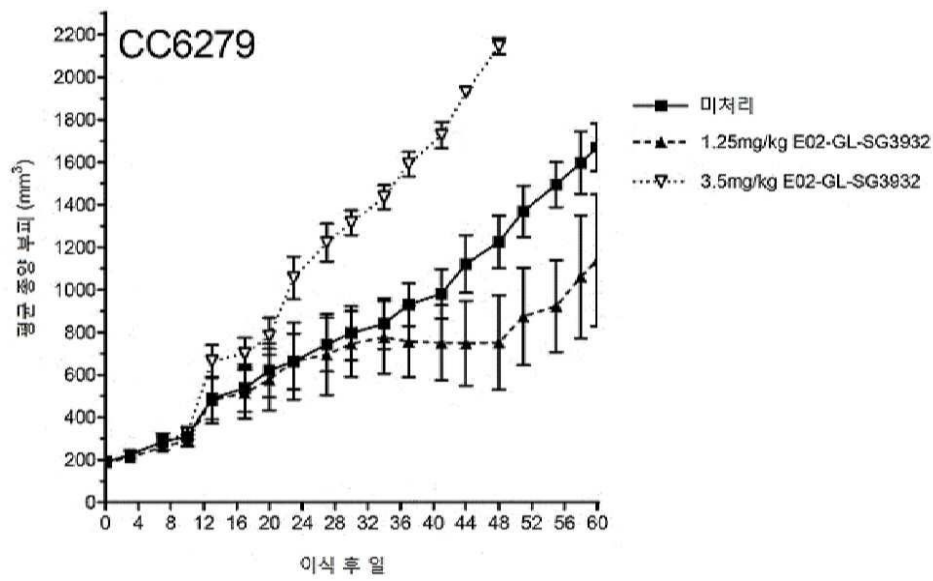
도면56b



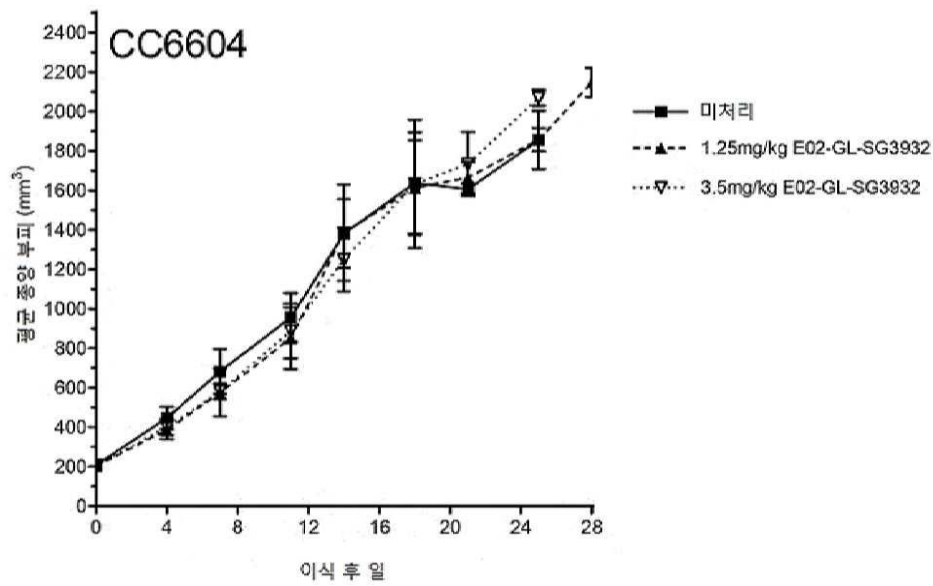
도면56c



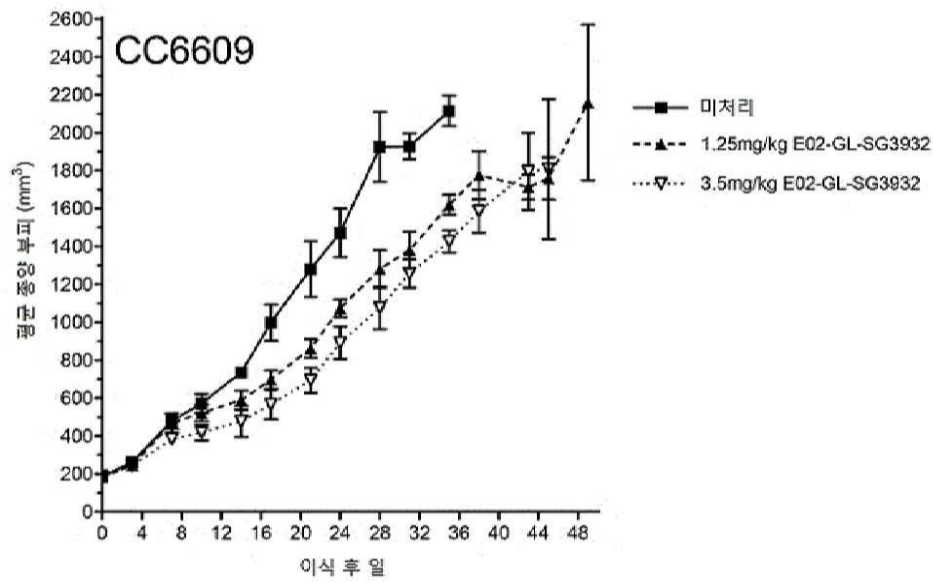
도면56d



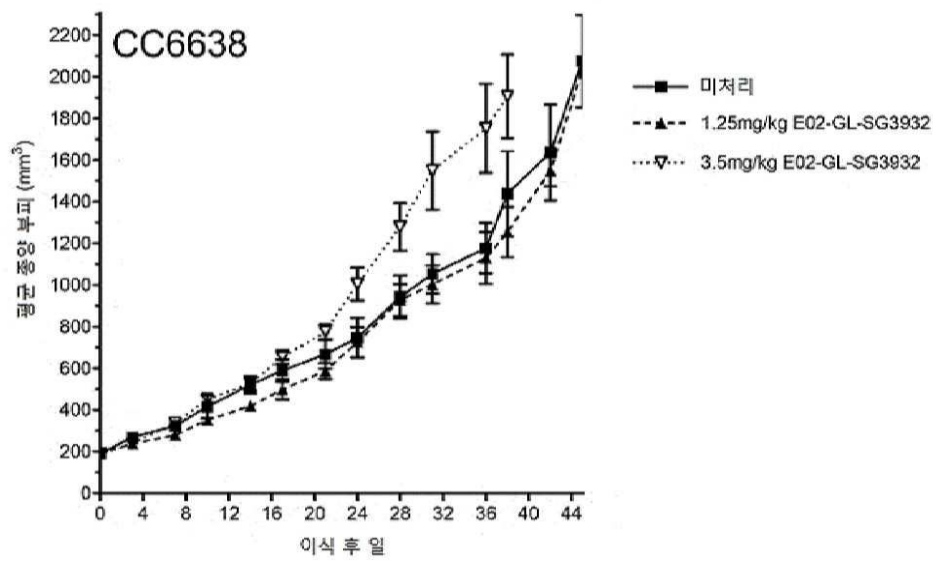
도면56e



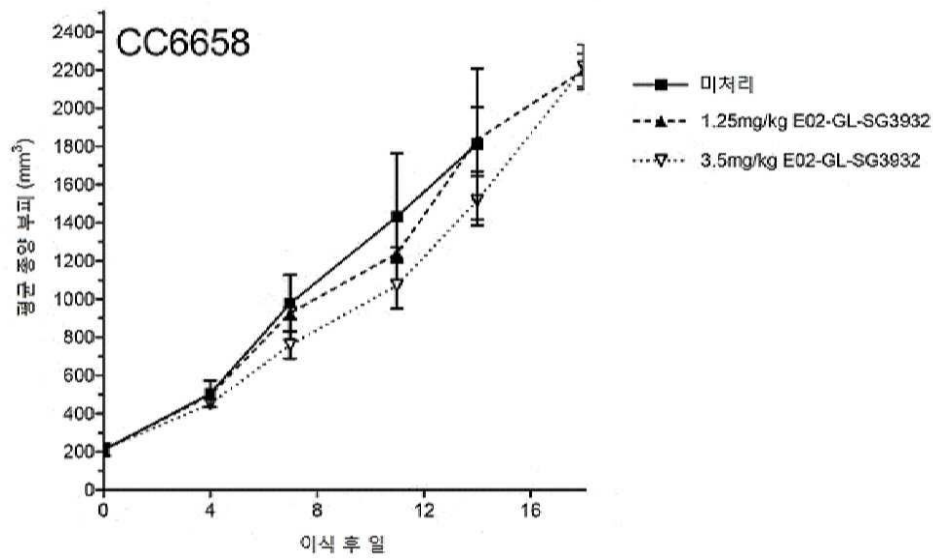
도면56f



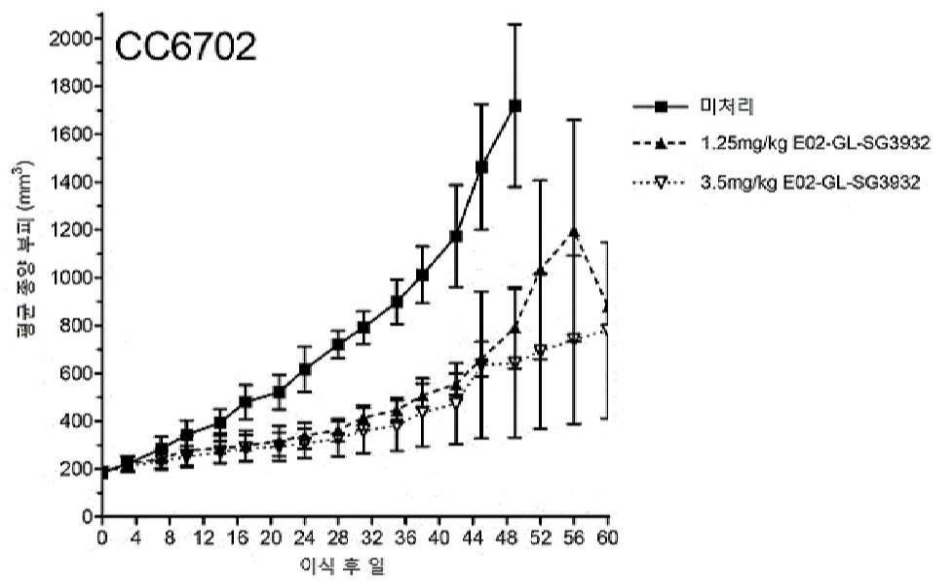
도면56g



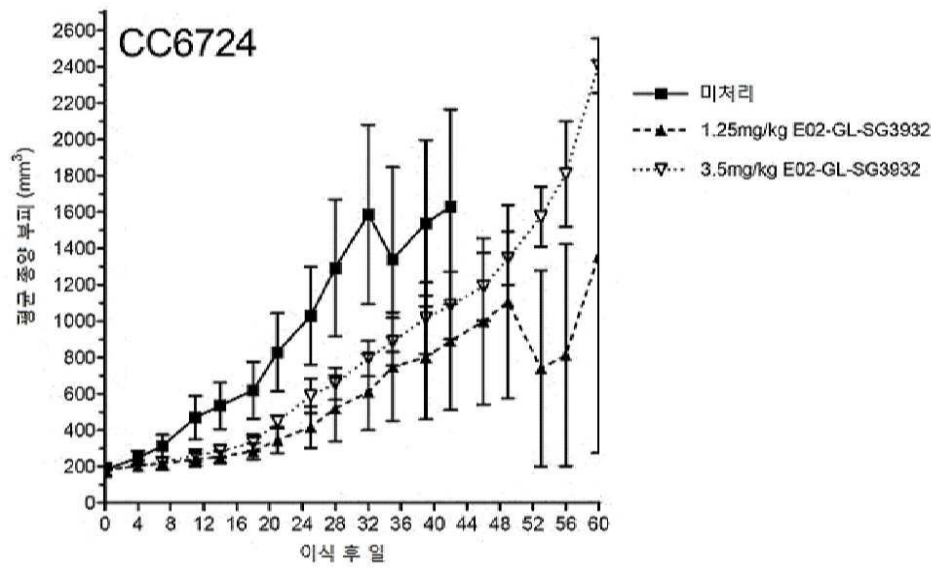
도면56h



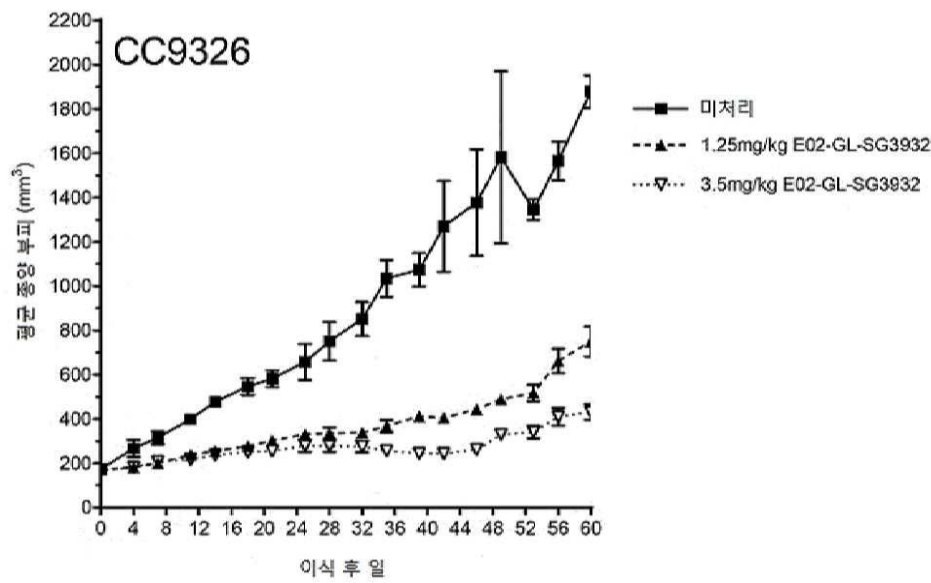
도면56i



도면56j



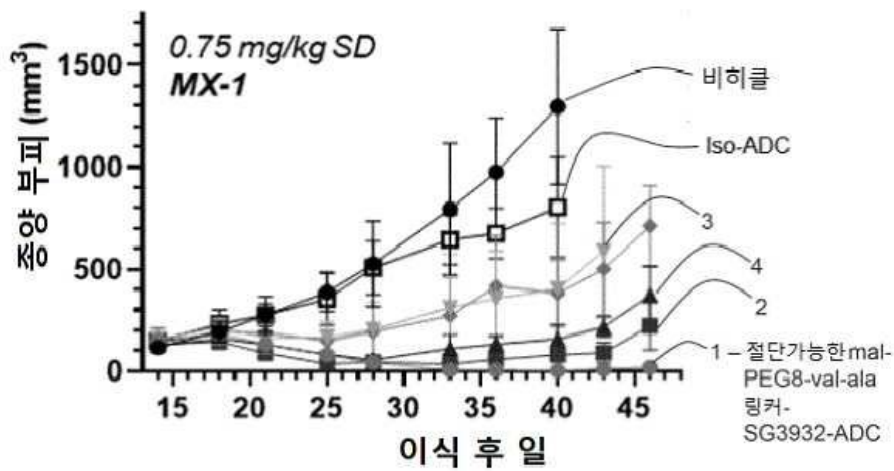
도면56k



도면57

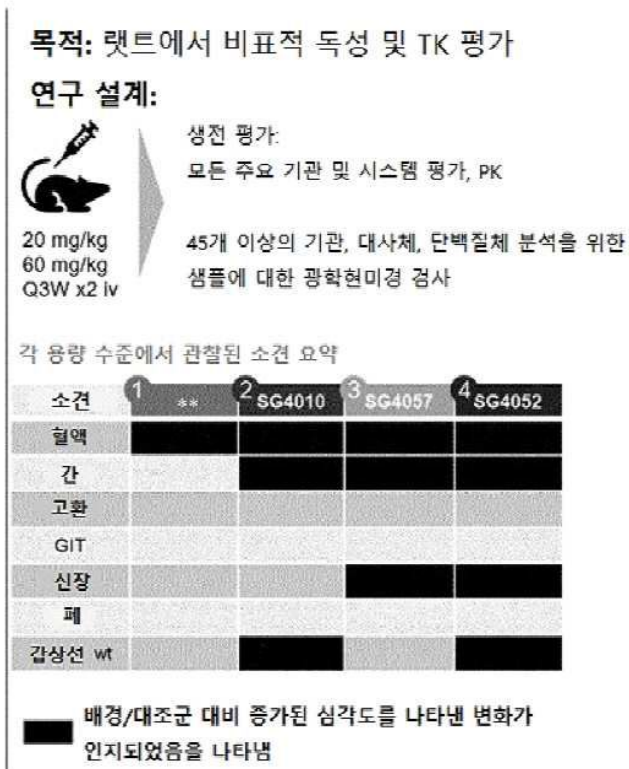
	ADC	링커-warhead
1	E02-INT-절단가능한 mal-PEG8-val-ala 링커-SG3932	mp PEG8 Val-Ala SG3932
2	E02-INT-SG4010	mc Val-Ala SG3932
3	E02-INT-SG4057	mp PEG8 GGFG SG3932
4	E02-INT-SG4052	mc GGFG SG3932

A



B

도면58

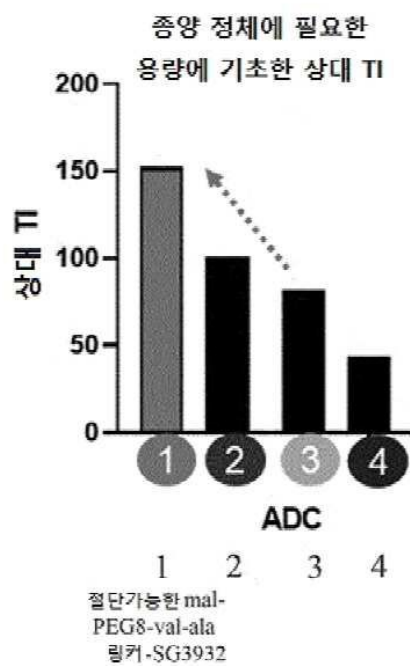


**절단 가능한 mal-PEG8-val-ala 링커-SG3932

도면59

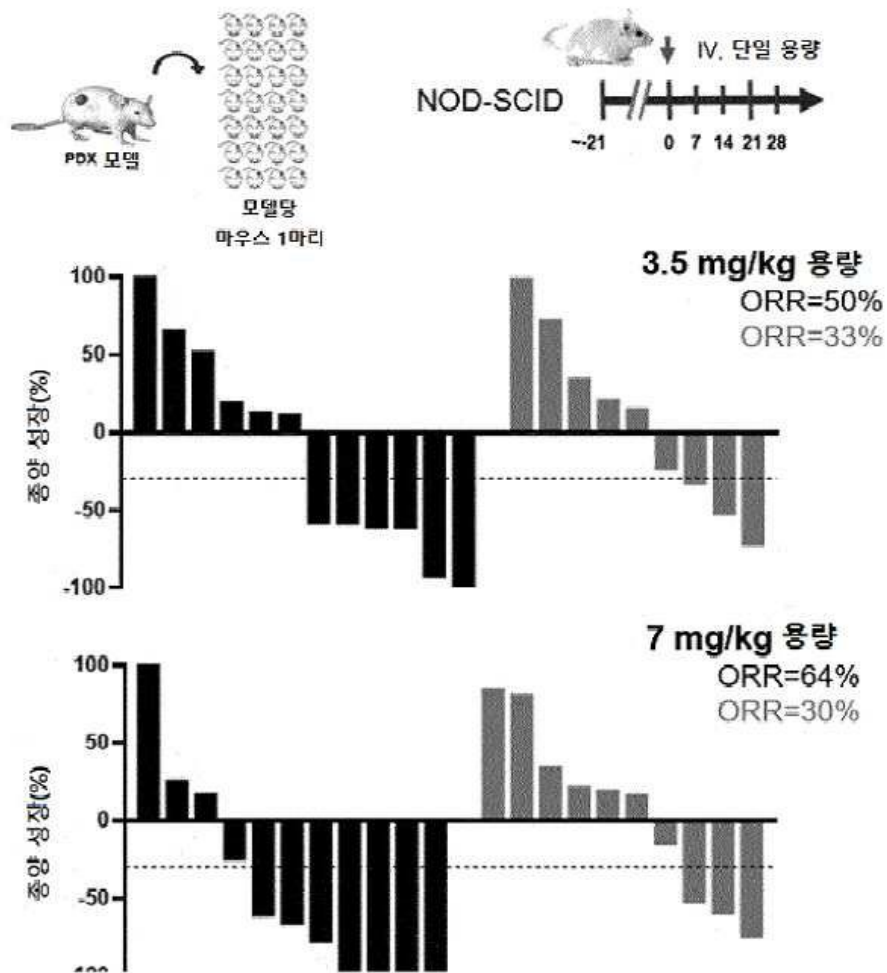
	ADC	링커-warhead
1	E02-INT-절단가능한mal-PEG8-val-ala 링커-SG3932	mp PEG8 Val-Ala SG3932
2	E02-INT-SG4010	mc Val-Ala SG3932
3	E02-INT-SG4057	mp PEG8 GGFG SG3932
4	E02-INT-SG4052	mc GGFG SG3932

A

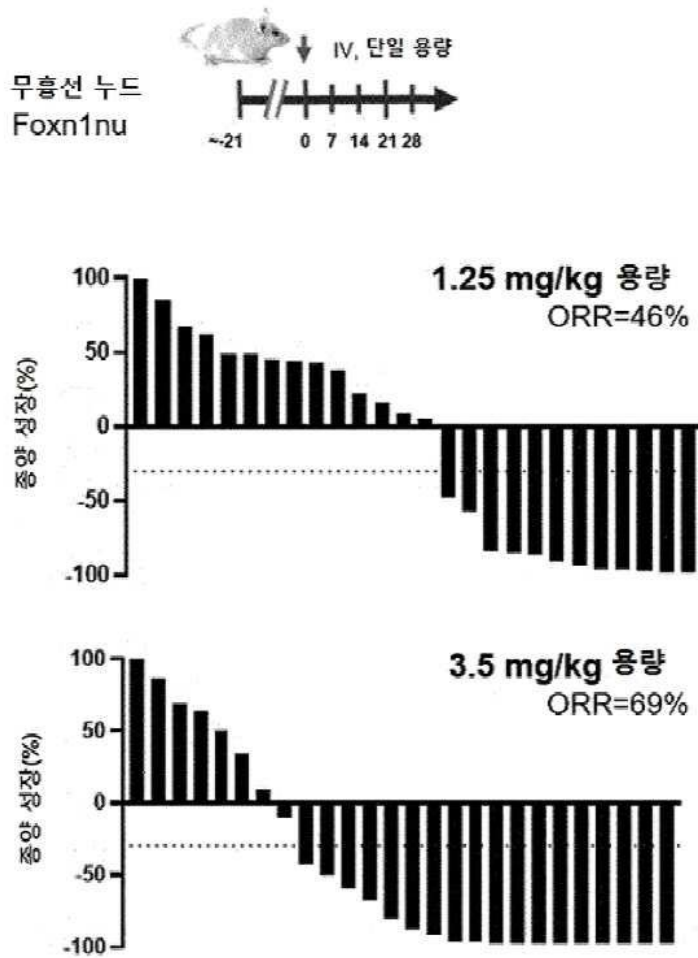


B

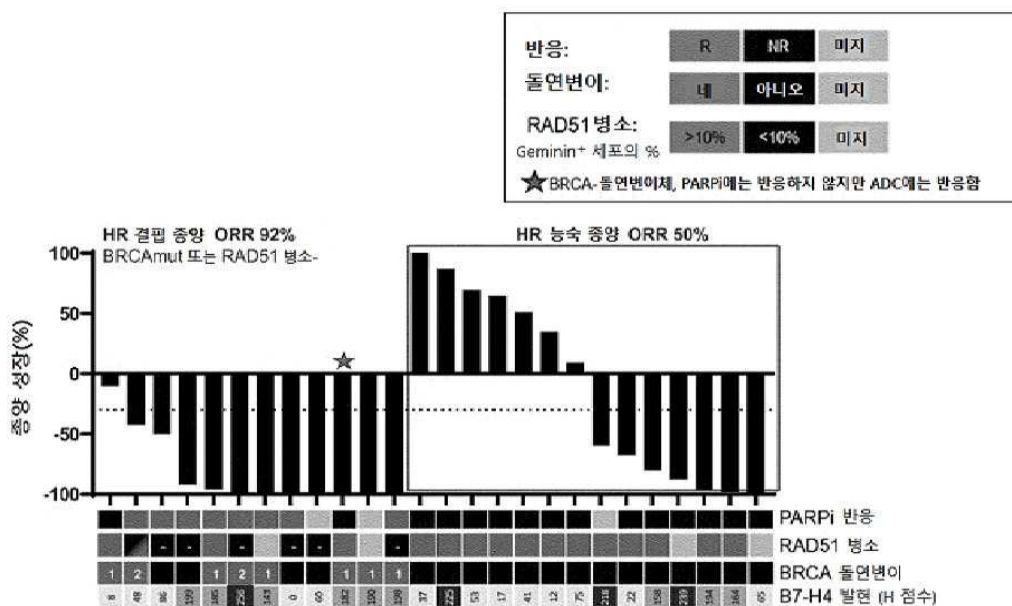
도면60a



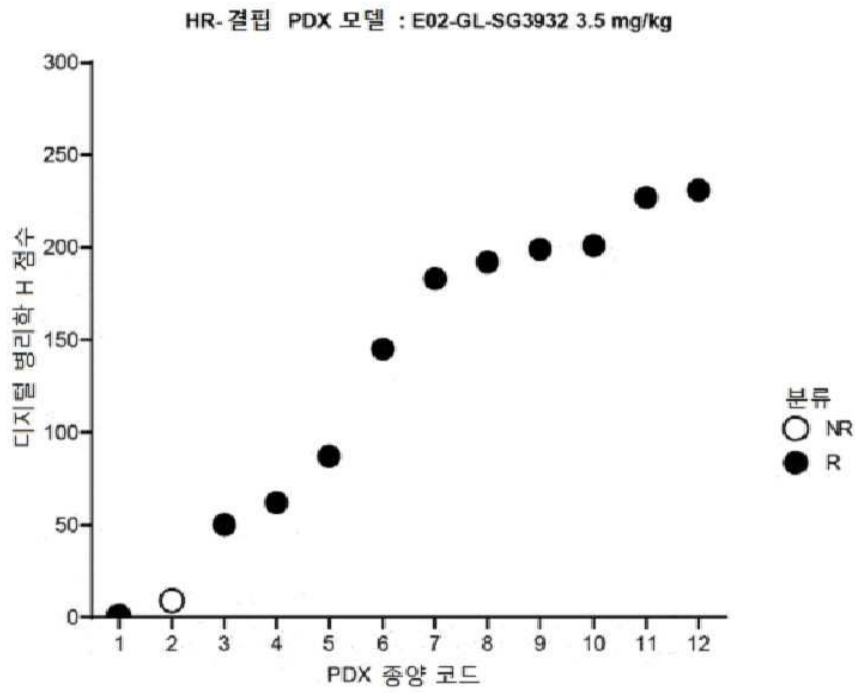
도면60b



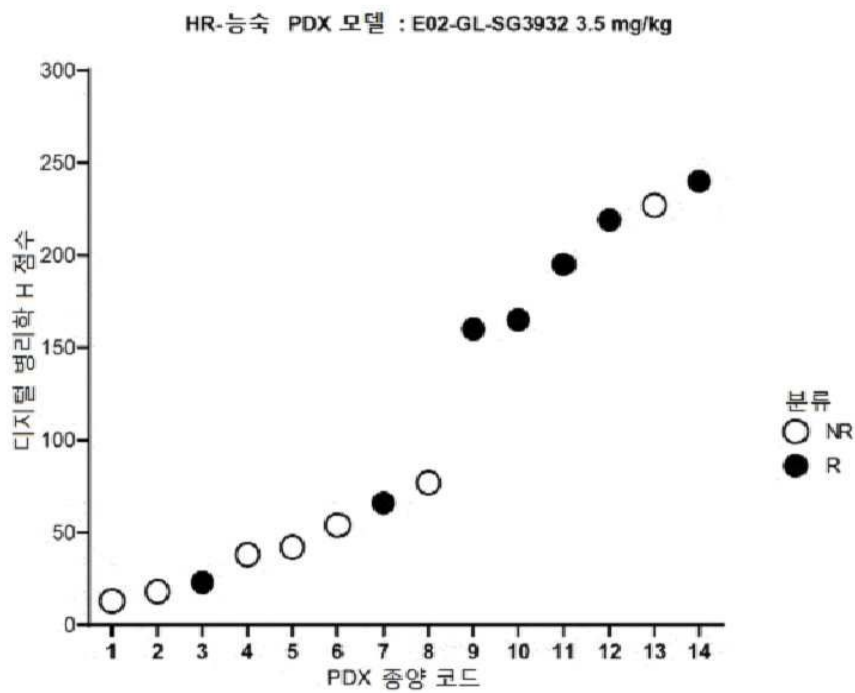
도면61



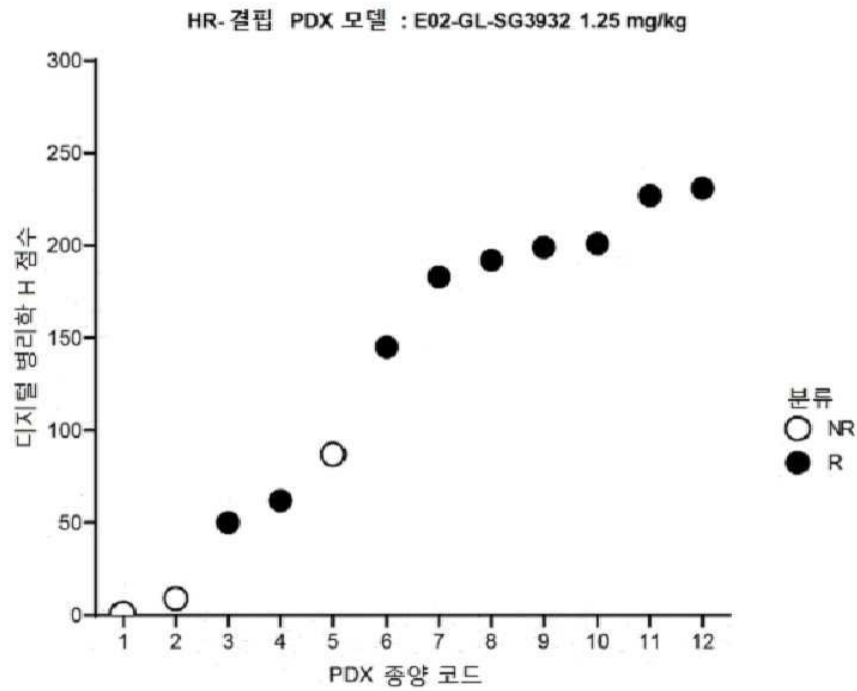
도면62a



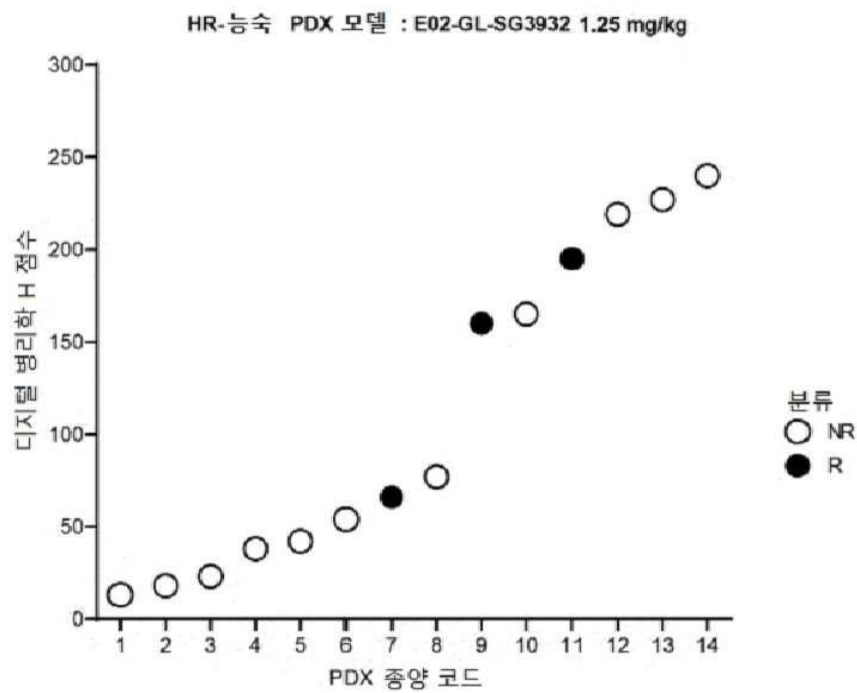
도면62b



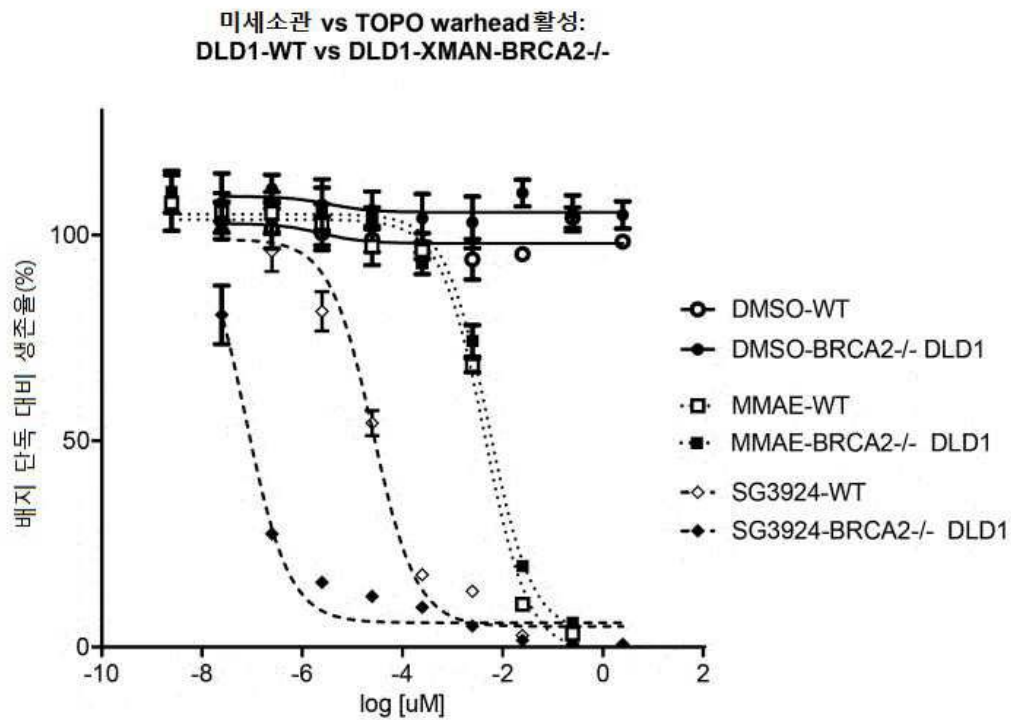
도면62c



도면62d



도면63



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MedImmune Limited

<120> Therapeutic Binding Molecules

<130> B7H4-100-WO-PCT

<150> US 63/077,207

<151> 2020-09-11

<160> 55

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Gly Tyr Tyr Trp Asn

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

Asn Leu Tyr Asn Trp Asn Leu Asp Ser

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

Gly Tyr Tyr Trp Asn

1 5

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser

1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Asp Val Gly

1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic

<400> 11

Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

Glu Lys Ala Leu Ala Thr Val Thr Pro Ser Gly Tyr Glu Asn Tyr Tyr

1 5 10 15

Thr Val Asp Val

20

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 19

Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 21

Glu Lys Ala Leu Ala Ser Val Ile Pro Ser Gly Tyr Glu Asn Tyr Tyr

1 5 10 15

Val Val Asp Val

20

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ala Gly Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 25

Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 26

Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

Asp Gly Val Gly Phe Asp Tyr

1 5

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Synthetic

<400> 30

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Tyr Thr

1 5 10

<210> 31

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asn Leu Tyr Asn Trp Asn Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45
Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 33

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210

> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Asp

20 25 30

Val Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 35

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Gly Ser Ile Ser Ser Gly

20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Thr Glu Lys Ala Leu Ala Thr Val Thr Pro Ser Gly Tyr Glu
100 105 110

Asn Tyr Tyr Thr Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser

130

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 37

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly

20

25

30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Glu Lys Ala Leu Ala Ser Val Ile Pro Ser Gly Tyr Glu

100

105

110

Asn Tyr Tyr Val Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val

115

120

125

Ser Ser

130

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 38

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ala Gly Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 39

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Val Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 40

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Phe Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Leu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 41

<211> 331

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Synthetic

<400> 41

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys Val Phe Leu Phe Pro
115 120 125

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
130 135 140

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
145 150 155 160

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
165 170 175

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
180 185 190

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
195 200 205

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
210 215 220

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
225 230 235 240

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
245 250 255

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

260 265 270
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 275 280 285
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 290 295 300
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 305 310 315 320

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 42

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 43

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 43

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

 50 55 60
 Ser Arg Ile Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210

> 44

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 44

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Val Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210
 <210> 45
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 45

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95
Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser

115
<210> 46
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 46

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95
Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 47

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 47

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Gln His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 48

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 48

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 49

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 49

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 50

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 50

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Gln His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 51
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Synthetic
 <400> 51
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 52

<211> 331

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 52

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50

55

60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65

70

75

80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85

90

95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100

105

110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys Val Phe Leu Phe Pro

115

120

125

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

130

135

140

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn

145

150

155

160

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

165

170

175

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val

180

185

190

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser

195

200

205

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

210

215

220

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu

225

230

235

240

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

245

250

255

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

260

265

270

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

275

280

285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

290	295	300	
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
305	310	315	320
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	325	330	
<210> 53			
<211> 858			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 53			
gccaccatgg cttccctggg gcagatctc ttctggagca taattagcat catcattatt			60
ctggctggag caattgcact catcattggc ttgtgtatct caggagaca ctccatcaca			120
gtcactactg tcgcctcagc tgggaacatt ggggaggatg gaatcctgag ctgcactttt			180
gaacctgaca tcaaacttct tgatatctg atacaatggc tgaaggaagg tgttttaggc			240
ttggtccatg agttcaaaga aggcaaagat gagctgtcgg agcaggatga aatgttcaga			300
ggccggacag cagtgtttgc tgatcaagtg atagttggca atgcctcttt gcggctgaaa			360
aacgtgcaac tcacagatgc tggcacctac aaatgttata tcatcacttc taaaggcaag			420
gggaatgcta accttgagta taaaactgga gccttcagca tgccggaagt gaatgtggac			480
tataatgcca gctcagagac cttgcggtgt gaggtcccc gatggttccc ccagcccaca			540
gtgtctctggg catcccaagt tgaccaggga gccaacttct cggaagtctc caataccagc			600
tttgagctga actctgagaa tgtgaccatg aaggttgtgt ctgtgctcta caatgttacg			660
atcaacaaca catactcctg tatgattgaa aatgacattg ccaaagcaac aggggatatc			720
aaagtgacag aatcggagat caaaaggcgg agtcacctac agctgctaaa ctcaaaggct			780
tctctgtgtg tctcttcttt ctttgccatc agctgggcac ttctgctct cagcccttac			840
ctgatgctaa aataataa			858
<210> 54			
<211> 846			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 54			
atggcttccc tggggcagat cctcttctgg agcataatta gcatcatcat tattctggct			60

ggagcaattg cactcatcat tggctttggt atttcagga gacactccat cacagtcact 120

actgtgcct cagctgggaa cattggggag gatggaatcc tgagctgcac ttttgaacct 180

gacatcaaac tttctgatat cgtgatacaa tggctgaagg aaggtgtttt aggcttggtc 240

catgagttca aagaaggcaa agatgagctg tcggagcagg atgaaatgtt cagaggccgg 300

acagcagtgt ttgtgatca agtgatagtt ggcaatgcct ctttgcggct gaaaaacgtg 360

caactcacag atgctggcac ctacaaatgt tatatcatca cttctaaagg caagggaat 420

gctaaccttg agtataaac tggagccttc agcatgccgg aagtgaatgt ggactataat 480

gccagctcag agaccttgcg gtgtgaggct ccccgatggt tccccagcc cacagtggtc 540

tgggcatccc aagttgacca gggagccaac ttctcggaag tctccaatac cagctttgag 600

ctgaactctg agaatgtgac catgaaggtt gtgtctgtgc tctacaatgt tacgatcaac 660

aacacatact cctgtatgat tgaaaatgac attgccaaag caacagggga tatcaaagt 720

acagaatcgg agatcaaaag gcggagtcac ctacagctgc taaactcaa ggcttctctg 780

tgtgtctctt ctttctttgc catcagctgg gcacttctgc ctctcagccc ttacctgatg 840

ctaaaa 846

<210> 55

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile

1 5 10 15

Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser

20 25 30

Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile

35 40 45

Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu

50 55 60

Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val

65 70 75 80

His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met

85 90 95

Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn
 100 105 110
 Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr
 115 120 125

 Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu
 130 135 140
 Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn
 145 150 155 160
 Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln
 165 170 175
 Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser
 180 185 190

 Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met
 195 200 205
 Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser
 210 215 220
 Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val
 225 230 235 240
 Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser
 245 250 255

 Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu
 260 265 270
 Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys
 275 280